



TITLE:

マボヤTボックス遺伝子HrTbx6の
機能発現機構の解析(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

三谷, 恭雄

CITATION:

三谷, 恭雄. マボヤTボックス遺伝子HrTbx6の機能発現機構の解析. 京都大学, 2001, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183024>

RIGHT:

マボヤTボックス遺伝子*HrTbx6*の機能発現機構の解析

京都大学大学院理学研究科

三谷 恭雄

目次

序文	1
材料と方法	5
1. ホヤ成体および胚の採集	
2. 顕微注入法	
3. エレクトロポレーション法	
4. <i>HrTbx6</i> 上流領域のコンストラクトの作製	
5. Tドメイン結合配列を欠いたコンストラクトの作製	
6. 顕微注入に用いたmRNAの作製	
7. pRN3GFPコンストラクトの作製	
8. <i>Ci-Tbx6</i> 、 <i>Ci-Tbx6-En</i> コンストラクトの作製およびサブトラクション	
9. 抗体染色	
10. 酵母を用いたレポーターアッセイ	
11. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	
結果	13
1. <i>HrTbx6</i> の機能解析	
1.1. <i>HrTbx6</i> の分子系統学的解析	
1.2. 過剰発現実験	
1.3. 機能阻害実験	
2. <i>HrTbx6</i> の転写調節機構の解析	
2.1. シスエレメントの解析	
2.2. Tドメイン結合配列	
2.3. <i>HrMA4</i> および <i>HrMHC</i> と <i>HrTbx6</i> の関係	
3. <i>Ci-Tbx6</i> ターゲット遺伝子の単離	
3.1. カタユウレイボヤ <i>Tbx6</i> ホモログの単離とサブトラクション	
3.2. サブトラクションライブラリーの解析	
4. 機能ドメインの解析	
4.1. Tドメイン以外の部分の役割	
4.2. キメラ遺伝子	
4.3. キメラ遺伝子の胚発生に及ぼす影響	

考察	25
----	----

1. HrTbx6の機能解析に関する考察
 - 1.1. 分子系統学的解析に関して
 - 1.2. 過剰発現の影響について
 - 1.3. HrTbx6の尾部先端での機能
2. 転写制御領域の解析に関する考察
 - 2.1. 転写制御領域に含まれるモジュール
 - 2.2. 筋肉での発現を担う領域
 - 2.3. 尾部先端での発現を担う領域
 - 2.4. Tドメインの認識配列
 - 2.5. *HrTbx6*の筋肉分化遺伝子カスケードにおける位置づけ
3. *Tbx6*のターゲット遺伝子の解析に関する考察
4. 機能ドメインの解析に関する考察
 - 4.1. C末側の転写活性化について
 - 4.2. Tドメインによる特異性の決定

謝辞	34
----	----

参考文献	35
------	----

図と表	42
-----	----

序文

1990年にマウスの短尾突然変異の原因遺伝子*Brachyury*が単離された(Herrmann et al., 1990)のち、アフリカツメガエル(Smith et al., 1991)、ゼブラフィッシュ(Shulte-Merker et al., 1992)、ホヤ(Yasuo and Satoh, 1993)、昆虫(Kispert et al., 1994)、ニワトリ(Kispert et al., 1995a)で相次いでそのホモログが単離された。これらの遺伝子はTドメインと呼ばれるDNA結合領域をN末側に持つ転写因子をコードすることが明らかにされている(Kispert and Herrmann, 1993; Müller and Herrmann, 1997)。その後、*Brachyury*ホモログ以外にもアフリカツメガエルの母性に存在する*VegT*(Zhang and King, 1996)やニワトリの肢芽で発現する*Tbx4*、*Tbx5*などのTボックス遺伝子も単離されている(Issac et al., 1998)。*VegT*は母性に植物極側で発現しており内胚葉および中胚葉の分化に深く関係していることが示されている(Zhang et al., 1998; Clements et al., 1999; Xanthos et al., 2001)。また、*Tbx4*は後肢において、*Tbx5*は前肢においてそれぞれ発現しているが、*Tbx4*を異所的に前肢芽で発現させた場合には前肢が鱗状の表皮を持つなど後肢の特徴を示すようになり、逆に*Tbx5*を異所的に後肢芽で発現させた場合には後肢が羽毛に覆われ羽を形成するなど前肢の特徴を示すようになることが明らかにされている(Takeuchi et al., 1999, Rodoriguez-Esteban et al., 1999)。つまり、*Tbx4*および*Tbx5*は肢芽が前肢になるか後肢になるかの運命決定において鍵となる働きをしていると考えられる。こうしたことから、Tボックス遺伝子は発生の様々なステージおよび組織で発現し、発生において重要な役割を果たす遺伝子のファミリーであると考えられている(Herrmann and Kispert, 1994; Smith, 1997, 1999; Papaioannou and Silver 1998)。現在ではTボックス遺伝子の解析は機能のほかに転写制御領域、ターゲットの解析が行われている(Smith, 1999)。また一方で個々の遺伝子の機能だけでなく、いかにしてTボックス遺伝子間での機能の特異性が生じるかという疑問

に対するアプローチもなされつつある(Sinha et al., 2000)。

Tボックス遺伝子が正しく機能するためには、発現領域および発現時期の限定においても、発現量の調節においても正確に制御されることが非常に重要であると考えられる。このことは、たとえば*Xbra*をわずかに量をかえて異所的に発現させた場合に結果的に大きく遺伝子発現のパターンを変えてしまうことから考えられる(O'Reilly et al., 1995)。転写制御機構の解明が重要であるにも関わらず、これまでのところ脊椎動物ではほとんど研究が進んでいない。マウス*Brachyury*の転写制御に関して*lacZ*をレポーター遺伝子として行った解析の結果、5'上流域430bpで原条での発現が認められるが、5'側8.3kbpおよび3'側5kbpでも脊索での発現は見られないことが示されている(Clements et al., 1996)。つまり、マウスにおいて脊索での特異的な発現を担う転写制御領域はさらに5'上流側や3'下流側あるいはイントロン領域に含まれると考えられる。こうしたことから、マウスをはじめとする脊椎動物での転写制御機構の解析は今後も困難が続きまとうものであると思われる。

多くのTボックス遺伝子の機能が明らかにされつつある今、Tボックス遺伝子はいかに機能しているのか、つまり、転写因子であるTボックス遺伝子の下流のターゲット遺伝子が何であるかということへの関心が高まっている。脊椎動物ではゼブラフィッシュやアフリカツメガエルでTボックス遺伝子のターゲット遺伝子の解析が行われている。ゼブラフィッシュでは*papc*が*spadetail*(Griffin et al., 1998)のターゲットに含まれることが示されており(Yamamoto et al., 1998)、アフリカツメガエルでは*Bix*(Tada et al., 1998)や*Xwnt11*(Tada et al., 2000; Saka et al., 2000)が*Xbra*のターゲットに含まれることが示されている。しかしながら、これらの解析においてはターゲット遺伝子のいくつかは明らかにされたにすぎない。転写因子としてのTボックス遺伝子の機能をより具体的に明らかにするためには、Tボックス遺伝子によって直接的に転写の制御を受けている遺伝子群すなわち下流のターゲット遺伝子のセットを明らかにしなければならない。

また一方で、個々のTボックス遺伝子の機能に関する知見が蓄積するにつれ、Tボックス遺伝子間でみられる非常に幅広い機能の違いが、いかにして共通のドメインを持つファミリー内で生じてくるのか、言い換えるならば、Tボックス遺伝子の機能の特異性はいかにしてもたらされるかという疑問に関心が及んでいる。Sinha et al. (2000)はヒトのTBX1およびTBX2が*in vitro*の実験で同じ塩基配列に結合しながらも転写活性化という点では別の働きをしていることを示しており、*in vivo*における機能の違いを明らかにする直接的な実験が待たれる。

尾索類ホヤは脊索動物の起源的な動物であると考えられており、最近分子系統学的にもその裏付けがなされつつある(Wada and Satoh, 1994; Cameron et al., 2000)。また、細胞系譜が明らかにされており、発生の初期に細胞運命の決定が起こることが明らかにされている(Nishida, 1987)。このような脊椎動物にはない利点を持つことから、ホヤはモデル生物として広く関心が持たれ、様々な研究が進められている(Satoh, 1994, 1998; Di Gregorio and Levine, 1998; Satou and Satoh, 1999)。ホヤにおいても*Brachyury*ホモログが単離されている。マボヤ*HrBra*(As-T; Yasuo and Satoh, 1993, 1994)およびカタユレイボヤ*Ci-Bra*(Corbo et al., 1997)である。いずれも脊索においてのみ発現する。*HrBra*の機能解析は進んでおり、細胞間の相互作用なしにそれだけで、脊索を分化させることができることが明らかにされている(Yasuo and Satoh, 1998)。つまり、*HrBra*が発現するだけで、そのターゲット遺伝子が誘導されると考えられる。このシンプルな系を利用して、*Ci-Bra*のターゲット遺伝子群が単離されている(Takahashi et al., 1999a)。*Ci-Bra*のターゲット遺伝子の一つとして単離された*Ci-trop*の転写制御領域にはTドメインの結合配列が存在し*Ci-Bra*が結合することで直接的に転写が制御されることが明らかにされている(Di Gregorio and Levine, 1999)。また、*HrBra*(Takahashi et al., 1999b)、*Ci-Bra*(Corbo et al., 1997)ともに転写制御領域の解析が進んでおり、領域特異的な発現をになうシスエレメントが明らかにされている。

マボヤではもう一つのTボックス遺伝子*HrTbx6*が単離されており、尾芽胚期では筋肉および尾部先端の表皮細胞で発現している(As-T2; Yasuo et al., 1996)。マウスでは*tbx6*は沿軸中胚葉と尾芽で発現しており(Chapman et al., 1996)、そのノックアウトマウスは体節が形成されず代わりに神経管が形成されることから、*tbx6*は体節の形成をつかさどる鍵となる働きをしていることが示唆されている(Chapman and Paipalioannou, 1998)。また、ゼブラフィッシュにおいても*tbx6*は腹側内中胚葉で発現がみられ、腹側中胚葉の決定に関わると考えられている(Hug et al., 1997)。こうしたことから、*HrTbx6*はホヤの初期発生において、中胚葉の分化や体軸の伸長において重要な働きをする可能性が考えられる。そこで本研究ではまず(1)*HrTbx6*の機能の解析を行った。マボヤ受精卵への顕微注入により*HrTbx6*の過剰発現を行った結果、異所的に筋肉特異的アクチン遺伝子およびミオシン重鎖遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった(Mitani et al., 1999)。次に(2)*HrTbx6*の転写制御領域を行った。その結果*HrTbx6*の尾部先端の表皮細胞における特異的な発現と筋肉細胞における特異的な発現はそれぞれ異なる転写制御領域によって担われていることが明らかになった。また、*HrTbx6*の筋肉細胞での発現を担う領域の近傍にはTドメインの結合コンセンサス配列によく似た配列が存在し、かつこの配列は*HrTbx6*自身の転写活性化に関わっていることが示唆された。さらに(3)*CiTbx6*のターゲット遺伝子の解析を行った。*Ci-Bra*ターゲット遺伝子の解析と同様にサブトラクション法により約150クローンを得た。また、Tボックス遺伝子ファミリー間での機能の違いがいかにして生じるかを検討するため、(4)*HrBra*および*HrTbx6*の機能ドメインの解析を行った。*HrBra*および*HrTbx6*のTドメインを入れ替えたコンストラクトを作製し合成mRNAをマボヤ受精卵に顕微注入した結果、*HrBra*のTドメインを持つキメラでは異所的に脊索細胞が、逆に*HrTbx6*のTドメインを持つキメラでは異所的に筋肉細胞がそれぞれ形成されている可能性が示唆された。

材料と方法

分子生物学における一般的な実験方法等はプロトコル集(Sambrook et al., 1989)に従ったので詳しい記述を省略する。

1. ホヤ成体および胚の採集

マボヤ(*Halocynthia roretzi*)の成体は、産卵期前に東北大学理学部附属臨海実験所(青森県青森市)および東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センター(岩手県大槌町)の付近で購入した。光と温度のコントロールにより放卵させ、他個体の精子懸濁液を加え媒精した。また、媒精の際には極少量の1M NaOHを加えることで精子の活性化を行った。受精した卵は濾過海水中で10-12℃で発生させた。胚発生は同調的に進行し、受精後約12時間で囊胚、約24時間で尾芽胚、約40時間で遊泳幼生となった。胚は適当なステージで*in situ*ハイブリダイゼーション用、あるいは抗体染色用に固定を行った。

カタコウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)の成体は、東北大学農学部附属海洋資源教育センター(宮城県女川町)付近、神奈川県横浜市および千葉県木更津市付近の東京湾にて採集を行った。また一部は京都大学農学部附属水産試験場(京都府舞鶴市)において人工的に生育させた成体を用いた。卵は成体の輸卵管を切開し採集した。他個体の輸精管より直接採集した精子を濾過海水で懸濁しマボヤ同様に活性化し、のち媒精した。媒精約5分後に卵を濾過海水で洗い、コリオン除去液(0.1% (W/V)チオグリコール酸ナトリウム、0.05%アクチナーゼE、pH11)で5分ほど処理した。実体顕微鏡下でコリオンが溶解されたことを確認したのち、数回濾過海水で洗浄しコリオンを取り除いた。コリオンを取り除いた胚は、付着を防ぐため1%寒天で覆ったシャーレに濾過海水を満たし16-20℃で発生させた。18℃で発生させた場

合、約6時間で囊胚、約12時間で尾芽胚、約24時間で遊泳幼生となった。胚は適当なステージで*in situ*ハイブリダイゼーション用に固定、あるいはmRNA抽出用に凍結保存した。

2. 顕微注入法

マボヤ受精卵をコリオン除去液で5分間ほど処理すると濾胞細胞がほぼ取り除かれる。この卵はガラス面などへの接着性を帯びるので海水中においたカバーガラスに張り付かせることができる。カバーガラス上に卵を並べるだけで特にホルダーなどを用いることなく顕微注入がおこなえるので短時間に連続的な顕微注入が可能である。顕微注入するコンストラクトは適当な濃度に調製し、注入量の目安とするため最終濃度 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようFast Greenを加えた。顕微注入の際には卵の直径のおよそ5分の1を目安に実体顕微鏡 (SZH12、オリンパス光学工業) 下で注入を行った。この量は計算上約15plである。

3. エレクトロポレーション法

カタコウレイボヤ胚への遺伝子導入の方法としてはエレクトロポレーション法を用いた。基本的な方法はCorbo et al. (1997)に従い、gene pulser(BIO RAD)を用いてコンデンサ容量 $225 \mu\text{F}$ 、電位差50Vの設定で行った。このときの半減時間定数は約12m秒であった。

4. *HrTbx6*上流領域のコンストラクトの作製

転写調節領域の解析には*HrTbx6*の5'上流域にレポーターとして*lacZ*をつないだコンストラクトを用いた。コンストラクト作製のためのベクターはpPD46.21 (Fire et al., 1990)を用いた。このベクターでは*lacZ*の5'側に核移行シグナルをコードする配列が付加されているため、発現は核で見られる。

マボヤゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、*HrTbx6*の5'上流域を含むゲノムクローンを単離した。遺伝子マッピングキット(Stratagene)を用いて制限酵素マップを作製し、これを参考に*HrTbx6*の5'上流域約2.2kbpをpBSIISK(+)にサブクローニングした。また、これをもとにしてPCRにより各ディリーションコンストラクトの作製を行った。サブクローニングした上流域を*HindIII*/*HincII*で切断した後pPD46.21の*HindIII*/*SmaI*部位に挿入し、-2164bpの上流域を持つコンストラクトを作製した。-2164から-556bpの上流域を持つコンストラクトはHd1754FおよびBh556Rを用いて増幅し、*HindIII*/*BamHI*で切断後pPD46.21の*HindIII*/*BamHI*部位に挿入し作製した。-1454、-1154、-854から-556bpまでを持つものに関してはそれぞれHd1454F、Hd1154F、Hd854FおよびBh556Rを用いて増幅し同様にサブクローニングを行った。また-230、-140、-104、-50から+40bpまでを持つものについても同様に作製した。このときのプライマーはそれぞれのHd230、FHd140F、Hd104F、Hd50FおよびBh40Rを用いた。これらのプライマーは以下の通り（小文字は制限酵素部位を付加するために付け加えた配列）。また、いずれのコンストラクトも塩基配列の確認を行い変異が入っていないことを確かめた。

Hd1745F ; cccaagcttgggAATATTTTAAATCGGGAG

Hd1454F ; cccaagcttgggGTGATTGAATGAAATATA

Hd1154F ; cccaagcttgggAGTGGTAAAAGGAATATA

Hd854F ; cccaagcttgggTAATTGTTTAGTTCCGTT

Bh556R ; cgggatcccgGACAACTGGTTTGTAAG

Hd230F ; cccaagcttgggACTATCTTGCTGCGTTTA

Hd140F ; cccaagcttgggAGCGAAAGGTTAAAGTAA

Hd104F ; cccaagcttgggAGTGGTAAAAGGAATATA

Hd50F ; cccaagcttgggATAGTTTCGGAAGTGAAT

Bh40R ; gggatcccgATGAGACTTACTAACAAG

5. Tドメイン結合配列を欠いたコンストラクトの作製

T_dを欠いたコンストラクトを作製するためにまずHd854F、dTdRおよびdTdF、Bh40Rを用いてPCRで増幅を行った。さらに、これらの産物を鋳型としてHd845F、Bh40Rを用いて増幅し、その産物を*Hind*III/*Bam*HIで切断しpPD46.21の同部位に挿入した。これを-351bpに存在する*Sty*I部位で切断し直鎖化して顕微注入に用いた。T_pを欠いたコンストラクトに関しても同様の方法で作成した。これらのプライマーは以下の通り。

dTdF ; CCATGGTTAATAGTACATCTTCCCTTCAAAAACCTCA

dTdR ; TGAGTTTTTTGAAGGGAAGATGTCATATTAACCATGG

dTpF ; GACCACACGTTTGTGTCCCGAATGCAATGAATACTA

dTpR ; TAGTATTCATTGCATTCGGGACACAAACGTGTGGTC

6. 顕微注入に用いたmRNAの作製

本研究で用いたmRNA合成のためのコンストラクトはすべてpBSRN3(Lemaire et al.,1995)にサブクローニングして作製した。pBSRN3はカエルへの顕微注入用mRNAを合成するために作製されたベクターであり、マルチクローニング部位の両側にカエルのグロビン遺伝子のUTRを持つ。このUTRは*in vitro*合成によって作られたmRNAの安定化に寄与するといわれている。このベクターにさらにGFPを挿入し目的遺伝子の3'末端側にGFPを持つmRNAの合成を行った。pEGFP(Clontech)を*A*fIII（切断後平滑化）および*B*gIIIで切り出し、pBSRN3の*Not*I（切断後平滑化）および*B*gIII部位に挿入し、pRN3GFPを作製した。ベクターに目的のcDNAを挿入し、*S*fiIにより直鎖化した後T3 mMessage mMachine(Ambion)を用いて*in vitro*転写をおこない5'キャップを持つmRNAの合成を行った。

7. pRN3GFPコンストラクトの作製

HrTbx6、*HrBra*のmRNA合成用コンストラクトを作製するためにPCRによって目的の遺伝子の増幅を行った。用いたプライマーの組み合わせはそれぞれT3、KpTbx6RおよびT7、KpBraRであり、PCR産物を*KpnI*/*HindIII*および*KpnI*/*XhoI*で切断した後、pRN3GFPの*KpnI*/*HindIII*および*KpnI*/*XhoI*部位にそれぞれ挿入した。キメラコンストラクトBra-Tbx6は、*HrBrac*DNAを鋳型としてT7およびBra-Tbx6Rにより増幅したPCR産物と、*HrTbx6*cDNAを鋳型としてBra-Tbx6FおよびTbx6Rにより増幅したPCR産物とを新たな鋳型としてT7およびTbx6Rにより増幅した後、*KpnI*/*HindIII*で切断しpRN3GFPの*KpnI*/*HindIII*部位に挿入し作製した。Tbx6-BraはT3、Tbx6-BraR、Tbx6-BraF、kpBraRを用いて同様にPCRをおこない*KpnI*/*XhoI*で切断した後、pRN3GFPの*KpnI*/*XhoI*部位に挿入した。Tbx6-Enもキメラ遺伝子と同様の方法でT3、Tbx6EnR、Tbx6EnF、EnRを用いて作製した。また、GFPの蛍光はSZX12およびSZX-RFL2（オリンパス光学工業）を用いて観察を行った。用いたプライマーは以下の通り。

T3 ; AATTAACCCTCACTAAAGGG

T7 ; GATATACGACTCACTATAGGGC

KpBraR ; GGGGTACCCCAAGTCTCAAAATTCTGTAA

KpTbx6R ; GGGGTACCCCCATTGTGACTAAATTGCT

Bra-Tbx6F ; GCATTTTTTGACGCAAAGGCCCGTGCTAAGAAACCC

Bra-Tbx6R ; GGGTTTCTTAGCACGGGCCTTTGCGTCCAAAAATGC

Tbx6-BraF ; GGATTCAGAGAGGACGGAGAGCGTCCTGATCAAACCT

Tbx6-BraR ; AGTTTGATCAGGACGCTCTCCGTCCTCTCTGAATCC

Tbx6-EnF ; CACTTCAGCGATAACATGGCCCTGGAGGAT

Tbx6-EnR ; ATCCTCCAGGGCCATGTTATCGCTGAAGTG

EnR ; TCCCAGAGCAGATTT

8. *Ci-Tbx6*、*Ci-Tbx6-En*コンストラクトの作製およびサブトラクション

*HrTbx6*のTボックス部分をプローブとしてカタユウレイボヤ初期原腸胚期ライブラリーのスクリーニングを行い*Ci-Tbx6*を単離した。*Ci-Tbx6*の過剰発現のためのコンストラクトの作製のために、*Ci-Tbx6* cDNAを鋳型としてT3および*CiTbx6KpR*をプライマーとしてPCRを行い*EcoRI*/*KpnI*で切断した後、pEGFPの*EcoRI*/*KpnI*部位に挿入した。これをさらに*AflIII*（切断後平滑化）/*BglIII*で切断し、*HrTbx6*上流域854bpを持つpPD46.21の*NotI*（切断後平滑化）/*BamHI*部位に挿入した。*Ci-Tbx6*の機能阻害のためのコンストラクトは*HrTbx6*の場合と同様にPCRにより作製した。このとき用いたプライマーは*CiTbx6EnR*、*CiTbx6EnF*、*EnKpR*、*CiTbx6KpR*であり、PCR産物は*Ci-Tbx6*コンストラクトと同様に、*HrTbx6*上流域854bpを持つpPD46.21の*NotI*（切断後平滑化）/*BamHI*部位に挿入した。用いたプライマーは以下の通り。これらのコンストラクトを用いてエレクトロポレーション法によりカタユウレイボヤ胚に導入し、それぞれの原腸胚期のライブラリーを作製した。ライブラリーの作製およびサブトラクション法はTakahashi et al. (1999)に従った。

CiTbx6KpR ; GGGGTACCCCATAAATCGGGCTAAATGA

CiTbx6EnR ; GCGATCCTCCAGGGCCATTCCATTTGAGCGAAAACC

CiTbx6EnF ; GGTTTTCGCTCAAATGGAATGGCCCTGGAGGATCGC

EnKpR ; GGGGTACCCCGGATCCCAGAGCAGATTT

9. 抗体染色

脊索のマーカーとして脊索特異的抗体Not-1(Nishikata and Satoh, 1990)を用いた。TSA蛍光システム(NEN life science products, Inc.)によって染色を行った。

10. 酵母を用いたレポーターアッセイ

レポーターアッセイのためのコンストラクトはpGBKT7(Clontech)を用いて作製した。HrBraのコンストラクトはPCRによる増幅の後、*NotI*で切断しpBS(SK+)の*SmaI/NotI*部位にサブクローニングし、さらに*NotI* (切断後平滑化) /*EcoRI*部位で切断しpGBKT7の*PstI* (切断後平滑化) /*EcoRI*部位に挿入し作製した。HrTbx6のコンストラクトはPCRによる増幅の後、*NotI*で切断しpBS(SK+)の*SmaI/NotI*部位にサブクローニングし、さらに*NotI/EcoRI*部位で切断しT4DNAポリメラーゼにより末端を平滑化した後pGBKT7の*PstI* (切断後平滑化) 部位に挿入し作製した。これらのプライマーは以下の通り。転写活性はレポーターあるいは栄養要求性を指標として調べた。用いた酵母株はY187およびAH109であり、形質転換および培養の方法は付属のマニュアルに従った。また、それぞれのコンストラクトに対して独立に少なくとも3回の実験を行った。

Bra199F ; GAGCGTCCTGATCAAACCT

Bra289NotR ; atagtttagcggccgcattcttatTGTGGCTTGGCAAGTGAG

Bra290F ; AGTTTCCCAGAGCCAGTT

Bra380NotR ; atagtttagcggccgcattcttatTGGCATGCCGCTGTTGAA

Bra381F ; GGGACAACATATCTGCCC

Bra472NotR ; atagtttagcggccgcattcttatTCAAAGTCTCAAATTCTG

Tbx6_326F ; GCCCGTGCTAAGAAACCC

Tbx6_445NotR ; atagtttagcggccgcattcttatCTGATTTGCTACACTGTT

Tbx6_446F ; TCCATTCATAACGTCCAA

Tbx6_565NotR ; atagtttagcggccgcattcttatATCTTTGAAAATTTCTTC

Tbx6_566F ; GATGGGAAGGTATTAGAC

Tbx6_682NotR ; atagtttagcggccgcattcttatACTCATTGTCAGTAAATT

11. *in situ*ハイブリダイゼーション法

マボヤ胚の*in situ*ハイブリダイゼーション法は基本的にはSatou et al. (1995)に従い、50℃でハイブリダイゼーションを行った。プローブとして用いた遺伝子は以下の通り。筋肉特異的ミオシン重鎖遺伝子(*HrMHC*; Araki et al., 1994)、筋肉特異的アクチン遺伝子(*HrMA4*; Kusakabe et al., 1991)、脊索特異的*Brachyury*遺伝子(*HrBra*; As-T; Yasuo and Satoh, 1993)、表皮特異的遺伝子(*HrEpiC*; Ishida et al., 1996)および尾部先端特異的遺伝子(*HrTT1*; Hotta et al., 1998)。また、カタユレイボヤ胚の*in situ*ハイブリダイゼーション法はCorbo et al. (1997)に従った。

結果

1. *HrTbx6*の機能解析

1.1. *HrTbx6*の分子系統学的解析

本研究では主に*HrTbx6*遺伝子に関して述べているが、*HrTbx6*は単離された当初は*As-T2*と呼ばれていた遺伝子である(Yasuo et al., 1996)。この遺伝子および他のTボックス遺伝子のTドメインのアミノ酸配列をもとに近隣結合法により分子系統樹を作成した結果(図1、2)、この遺伝子が*Tbx6*のサブファミリーに属することが示されたので、この遺伝子を*HrTbx6*(*Halocynthia roretzi Tbx6*)と呼ぶことにした。また、同様に*As-T*(Yasuo and Satoh, 1993)は*HrBra*(*Halocynthia roretzi Brachyury*)と呼ぶことにした。

1.2. 過剰発現実験

*HrTbx6*の機能を調べるためにまずマボヤ受精卵への合成mRNAの顕微注入により過剰発現を行った。*HrTbx6* mRNAの発生に及ぼす影響は量依存的であり、0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で顕微注入を行った場合には神経胚期頃まではほぼ正常に発生したが、尾芽胚期になると尾部の伸張がみられず尾部が膨らんだ胚の形成が観察された(図3B)。一方、濃度を上げて0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で顕微注入を行った場合には原腸胚期頃から発生が著しく異常になり、原腸陥入はほとんどみられず尾芽胚期にはほぼ球状の胚になり、正常胚の組織や器官との対応は全くつかなくなった。(図3C)。

表現型の観察だけでは過剰発現によって胚がどのような影響を受けたのか明確ではないので、*in situ*ハイブリダイゼーションにより*HrTbx6*過剰発現胚で組織特異的遺伝子の発現がどのような影響を受けたかを解析した。0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6* mRNAを顕微注入し、110細胞期で固定した後いくつかの組織特異的マーカー遺伝

子を用いて解析を行った。*HrTbx6*は筋肉細胞で発現するので、まず筋肉細胞で特異的に発現する遺伝子に関して*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、過剰発現による影響を調べた。その結果、顕微注入胚では筋肉特異的アクチン(*HrMA4*)およびミオシン重鎖遺伝子(*HrMHC*)がそれぞれ異所的に発現していることが観察された(図4B,D)。この異所的な発現は動物極側の細胞で顕著にみられた。動物極側の細胞は本来表皮細胞の発生運命を持っているので、過剰発現を行った胚における表皮特異的遺伝子(*HrEpiC*)の発現を調べたところ、この遺伝子を発現する細胞の数が大幅に減少していることが観察された(図4F)。

*HrTbx6*はTドメインを持つ転写因子であることから、その過剰発現ではほかのTドメインを持つ遺伝子が影響を受けた可能性も考えられる。そこで*HrBra*に関してその発現を調べたところ、*HrBra*を発現している細胞数がやや減少しているような傾向がみられたものの、筋肉および表皮特異的遺伝子においてみられたほど顕著な影響はみられなかった(図4H)。

*HrTbx6*は尾部先端の表皮細胞でも発現していることから、この領域でも何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、マボヤの尾部先端でのみ特異的に発現している遺伝子*HrTT1*の発現に関しては顕微注入による影響はみられなかった。

1.3. 機能阻害実験

過剰発現の結果から*HrTbx6*は筋肉細胞の分化において機能している可能性が示唆される。しかしながら、過剰発現だけでは遺伝子の機能は明確にならないので、機能阻害実験を行った。顕微注入による遺伝子の機能解析ではアフリカツメガエルでの実験結果がもっとも豊富であり、機能阻害実験に関しても多数の報告がある。方法としては、ショウジョウバエの*Engrailed*遺伝子の転写抑制ドメインをDNA結合ドメインにつなぎ、そのmRNAを顕微注入するというものである(Conlon et al.,

1996)。この方法によって*HrTbx6*の機能阻害を試みた。

*HrTbx6*のTボックスに*Engrailed*の転写抑制領域を含む配列をアミノ酸置換が起こらないようフレームをあわせてつないだコンストラクト(*HrTbx6-En*)を作製し、その合成mRNAをマボヤ受精卵に顕微注入した。0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で顕微注入を行った場合110細胞期までの発生は見た目上は正常であり、110細胞期で固定し筋肉特異的アクチンおよびミオシン重鎖遺伝子の発現を*in situ*ハイブリダイゼーション法により調べたところ正常胚と同様であった(図5A,C)。また、尾芽胚期では尾部が伸張せず表現型としての異常が見られたが、アクチンおよびミオシン重鎖遺伝子の発現は正常胚の発現領域に相当すると考えられる領域で認められた(図5B,D)。0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で顕微注入を行った場合には110細胞期ではアクチンおよびミオシン遺伝子の発現がほぼ消失し、多くとも2つの細胞でその発現がみられるだけであった(図6A,C)。尾芽胚期では正常胚に比べると弱いながら抑制されているようであったが、110細胞期でみられたような劇的な発現の抑制はみられなかった(図6B,D)。

*HrTbx6-En*の胚発生に及ぼす影響が*HrTbx6*に対して特異的なものかどうか検討するために、*HrTbx6-En*と*HrTbx6*の共注入実験を行った。*HrTbx6-En* mRNA(0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)と*HrTbx6* mRNA(0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)で共注入を行うと、ミオシン重鎖遺伝子の発現が正常胚程度に回復した。さらに、*HrTbx6-En* mRNA(0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)と*HrTbx6* mRNA(0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)で共注入を行うと異所的にミオシン重鎖遺伝子の発現が誘導された(図7B,C)。また、*HrTbx6*と同様にTドメインを持つ遺伝子*HrBra*との共注入を行った場合には、共注入の量の多少に関わらず、ミオシン重鎖遺伝子の発現への影響は観察されなかった(図7D,F)。ここでは図は示していないが、アクチン遺伝子の発現に関しても共注入を行った胚での解析を行ったが、同様の結果が得られた。

2. *HrTbx6*の転写調節機構の解析

2.1. シスエレメントの解析

発生においては遺伝子の機能がいつ発現するか（発現時期）、どの組織で発現するか（発現領域）、あるいはどの程度発現するか（発現量）といった遺伝子の発現が正確にコントロールされなければならない。こうした転写制御領域の解析の重要性が指摘され、マウスやアフリカツメガエルを中心にその解析が進められている。しかしながら、これら脊椎動物においてはゲノム構造の複雑さのために解析は容易ではない。一方、ホヤではこれまでにいくつかの遺伝子に関して転写調節領域の解析が行われており、いずれの場合にも比較的短い5'上流域が組織特異的な発現において十分であることが明らかにされている(Araki et al., 1996; Corbo et al., 1997; Takahashi et al., 1999)。

マボヤゲノムライブラリーから*HrTbx6*の5'上流域約2.2kbpを単離し、その全塩基配列を決定した(図8A)。*HrTbx6*cDNAの5'末端を+1として上流域における塩基の位置を示すことにした。*HrTbx6*の5'上流域にはTATA配列が存在しなかったため、以下の上流解析においては+40より上流側を用いた。まず-2164から+40までをPCRによって増幅しpPD46.21にサブクローニングし、*Hind*IIIで直鎖化したのち1ng/ μ lの濃度でマボヤ受精卵に顕微注入を行った。中期尾芽胚期頃に固定し、レポーターであるLacZの活性を組織化学的に検出したところ、異所的な発現も伴うものも含めて約68%(n=91)の胚で筋肉および尾部先端の表皮細胞でレポーター遺伝子の発現が認められた(図9A)。この結果から、-2164から+40bpまでの配列が*HrTbx6*の領域特異的な発現に必要なシスエレメントを含んでいると考えられる。

次に-351から+40bpに関して同様の実験を行った結果、高い頻度で筋肉細胞でのレポーター遺伝子の発現がみられた(図9B)。また、この場合筋肉での発現と同時に異所的な発現を示す胚が多くみられたが、これは主に表皮細胞であった。このこ

とから*HrTbx6*の5'上流域-351bpが筋肉での発現を担うシスエレメントを含んでいると考えられる。そこでこのコンストラクトをもとにさらに5種類のコンストラクトを作製し、同様の解析を行った(図10)。筋肉細胞での発現の特異性がもっとも高かったのは-230bpの場合であり、およそ57%の胚で筋肉細胞でのみレポーター遺伝子の発現がみられた。さらに-104bpの場合にも筋肉細胞での発現がみられた。ところが-50bpの場合にはレポーター遺伝子の発現は、筋肉細胞も含めあらゆる細胞で観察されなかった(図11)。

-2164bpの場合には筋肉および尾部先端の表皮細胞でレポーター遺伝子の発現がみられるのに対し、-351bpの場合には尾部先端の表皮細胞での発現がみられないことから、この細胞での領域特異的な発現は-351bpより上流側によって制御されていると考えられる。-2164から-555bpの上流域を用いて同様の実験を行ったところ、尾部先端の表皮細胞でのレポーター遺伝子の発現が観察された(図9C)。このコンストラクトをもとにさらに4種類のコンストラクトを作製した(図10)。-1754から-556bp、-1454から-556bp、-1154から-556bpではいずれの場合にもレポーター遺伝子の発現は全くみられなかった(図11)。-854から-556bpの場合には表皮細胞や筋肉細胞を含めて様々な細胞でレポーター遺伝子の発現がみられたが尾部先端での特異的な発現は観察されなかった。こうしたことから-2164から-1754bpに尾部先端の表皮細胞での発現を担うシスエレメントが含まれると考えられる。

2.2. Tドメイン結合配列

転写因子であるTボックス遺伝子産物は、Tドメインと呼ばれる領域を介してDNAと結合し機能している。Tドメインが結合する配列はランダムオリゴによる解析(Kispert and Herrmann, 1993; Kispert et al, 1995)やX線による結晶構造の解析(Müller and Herrmann, 1997)によって明らかにされている。

*HrTbx6*の上流の塩基配列を詳しく調べたところTドメインの結合コンセンサス

配列(5'-TTTCACACCT-3')ときわめて相同性の高い配列が2ヶ所存在することが明らかになった。すなわち、-330bp近傍に5'-TTTCACACTT-3' (T_d と名付けた)および、-250bp近傍に5'-GTTTCACACTT-3' (T_p と名付けた)が認められた。このことから*HrTbx6*の発現はそれ自身によっても制御されている(オートレギュレーション)可能性が考えられる。

この可能性を検討するために T_d および T_p を含む-351bpの上流域を持つコンストラクト($1\text{ng}/\mu\text{l}$)と*HrTbx6* mRNA($0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)の共注入をおこない、異所的に*HrTbx6*を発現させた場合に、レポーター遺伝子の発現が異所的に生じてくるかどうかを調べた。*HrTbx6* mRNAの顕微注入を行った場合、特に原腸胚期以降では著しい発生異常が見られ正常胚との対応がつけられなくなるおそれがある。また一方で発生の早い時期ではLacZタンパク質の蓄積が十分ではないため発色がみられない。そこで110細胞期以降サイトカラシンBにより卵割を阻害し中期尾芽胚期に相当する時期まで発生させた後、固定しレポーター遺伝子の発現を観察した。その結果、上流域だけで顕微注入を行った場合にはほとんどみられない異所的な発現が多くの細胞でみられた(図12F)。共注入を行った場合レポーター遺伝子の発現がみられる細胞数の平均値は $4.4(n=42)$ であり、上流のみの注入を行った場合の平均値 $1.7(n=36)$ に比べて明らかな増加がみられた。一方で、 T_d および T_p を含まない-230bpの上流域を持つコンストラクト($1\text{ng}/\mu\text{l}$)と*HrTbx6* mRNA($0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)の共注入を行った場合には異所的なレポーターの発現はみられなかった(図12C)。この場合レポーターの発現がみられる細胞数の平均値は $1.3(n=39)$ であり、上流のみの場合の平均値 $1.0(n=40)$ との間で有意な差は認められなかった。これらの結果から*HrTbx6*の転写制御には5'上流域に含まれるTドメインの結合配列を介したオートレギュレーションが働いている可能性が示唆される。

*HrBra*も*HrTbx6*同様にTドメインを持つ遺伝子であり、同じ塩基配列を認識し

てDNAに結合する可能性が考えられる。そこで、-351bpの上流域を持つコンストラクト(1ng/ μ l)と*HrBra* mRNA(0.2 μ g/ μ l)の共注入実験を行った。もし*HrBra*タンパク質が*HrTbx6*の上流域に存在するTドメインの結合配列に結合し転写を活性化できるとすれば*HrTbx6*との共発現を行った場合と同様に異所的なレポーター遺伝子の発現がみられるはずである。しかしながら、*HrBra*との共発現を行った結果、異所的なレポーター遺伝子の発現はみられなかった(図13)。また、発現のみられる細胞数の平均値は0.6(n=38)であった。すなわち、上流域だけの顕微注入を行った場合の結果と著しい違いはみられなかった。この結果から、*HrBra*タンパク質は*HrTbx6*タンパク質が認識して結合する配列には結合できないか、あるいは結合できたとしても転写活性化因子として働くことができないと考えられる。

*HrTbx6*の上流域にはT_d、T_pの2つのTドメインの結合配列と類似の配列が存在するが、*HrTbx6*のオートレギュレーションにおいてどちらも必要なのであろうか。T_dおよびT_pそれぞれの役割を検討するために-351bpからそれぞれの10bpを削ったコンストラクトを作製し、-351bpの上流域で行った場合と同じ条件で*HrTbx6* mRNAとの共注入実験を行った。その結果、T_dを削った場合には共注入によって異所的な発現が誘導されるのに対し、T_pを削った場合には共注入による異所的な発現は観察されなかった(図14)。このことから、*HrTbx6*のオートレギュレーションにおいてはT_pがより重要な働きをしていると考えられる。

2.3. *HrMA4*および*HrMHC*と*HrTbx6*の関係

*HrMA4*および*HrMHC*の転写制御領域の解析が行われており(Araki et al., 1996; Hikosaka et al., 1994)、それぞれの遺伝子の5'上流域の塩基配列が明らかにされている。この領域を詳しく調べといずれの上流域にもTドメインの結合配列とよく似た配列が存在することが明らかになった。このことから*HrTbx6*がこの配列に結

合しの転写を直接的に活性化する可能性が考えられる。そこで、これらの遺伝子の
上流域とHrTbx6 mRNAとの共注入実験を行い、これまでと同様にレポーター遺伝
子の発現を解析した。HrMA4(図15)およびHrMHC(図16)いずれの場合も結果は同
様であり、HrTbx6 mRNAとの共注入を行った場合には上流域のTドメインの結合配
列の有無に関わらず異所的にレポーター遺伝子の発現が誘導された。この結果は
HrTbx6が直接的にHrMA4およびHrMHCの上流域に結合することを必ずしも支持
するものではない。しかしながら、上流域のみの顕微注入を行った場合のレポー
ター遺伝子の発現は、Tドメインの結合配列を含まない場合に比べてTドメインの結
合配列を含む場合の方が明らかに強く活性化されている(図15A,C、図16A,C)。これ
らの結果から、HrMA4およびHrMHCはHrTbx6による直接的な転写活性化の他に、
HrTbx6の異所的な発現によって発現が上昇した他の因子による転写の活性化を受け
ているものと考えられる。

3. Ci-Tbx6ターゲット遺伝子の単離

3.1. カタユウレイボヤTbx6ホモログの単離とサブトラクション

マボヤでの過剰発現および機能阻害実験の結果から、マボヤの筋肉細胞の形成
においてはHrTbx6の発現が一つの鍵となっていると考えれる。つまり、HrTbx6が
発現することによって筋肉細胞を形成するために必要な遺伝子のセットの発現が誘
導されることが考えられる。そこで、過剰発現を行った胚と機能阻害を行った胚との間
で発現している遺伝子の差をみれば筋肉形成に関わる遺伝子のセットが明らかにな
るのではないだろうかと考えた。

マボヤの利点は養殖されているため成体の供給という点で非常に安定している
ことや、ホヤとしては比較的卵が大きく顕微注入などの胚操作が容易であることが

あげられる。しかしながら、顕微注入を行った胚をもとにライブラリーを作製しようとする膨大な数の顕微注入を行うか、PCR法を用いなければならない。一方、カタユレイボヤではエレクトロポレーション法により一度に大量の遺伝子導入胚を採集することが可能であり、PCRを用いずに、RNA量をより正確に反映したライブラリーが作製できる。そこでターゲット遺伝子の単離にはカタユレイボヤを用いた。

カタユレイボヤの初期原腸胚期ライブラリーから*HrTbx6*のホモログ(*Ci-Tbx6*)を単離し、*in situ*ハイブリダイゼーション法によりmRNAの発現を解析したところ筋肉細胞で発現が認められた(図18)。エレクトロポレーション法によるmRNAの導入は事実上不可能であるため、*HrTbx6*のプロモーターの制御下に*Ci-Tbx6*をつないだコンストラクトを作製しこれを用いて過剰発現あるいは機能阻害をおこなった。機能阻害に関してはマボヤ同様*Engrailed*の転写抑制ドメインを用いた。また、いずれのコンストラクトにもGFPを3'末端側につないであり、その蛍光を観察することで導入された遺伝子がタンパク質に翻訳されていることを確認した(図19)。

受精卵にエレクトロポレーションを行った後、中期原腸期頃まで発生させ胚を集め、過剰発現胚からのcDNAライブラリーおよび機能阻害胚からのcDNAライブラリーを作製し、それをもとにサブトラクションライブラリーを作製した。

3.2. サブトラクションライブラリーの解析

サブトラクションによって得られたクローンは約200クローンであった。これらすべてのクローンについて5'側および3'側の約550bpの塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、このサブトラクションライブラリーには独立な144クローンが含まれていることがわかった。これらすべてのクローンに対してもっとも相同性の高かった遺伝子を表に示した。

4. 機能ドメインの解析

4.1. Tドメイン以外の部分の役割

Tボックス遺伝子のコードするタンパク質では、N末側のTドメインがDNA結合ドメインとして機能しているのに対し、C末側は転写の活性化に関わっていることが示されている(Conlon et al., 1996)。HrTbx6タンパク質も機能解析の結果や上流領域との共注入の結果から転写活性化因子であると考えられる。

HrBraおよびHrTbx6のC末側が転写の活性化に関わっているかどうかを明らかにするために、酵母のGAL4システムを用いて解析を行った。HrBraおよびHrTbx6のC末側を3つの領域に分けてGAL4のDNA結合ドメインにつなぎ、図20に示すようなそれぞれ6種類のコンストラクトを作製した。それぞれを酵母に導入しUAS::lacZをレポーターとして転写活性化に関して調べたところ、陽性反応のみられる領域が存在した(図20)。また、栄養要求性を指標として解析を行った場合にもほぼ同様の結果が得られた。

4.2. キメラ遺伝子

Tボックス遺伝子そのものの機能に関しては多くの知見が蓄積し、Tボックス遺伝子は様々な発生の段階で様々な組織で発現し機能していることが明らかにされている。Tボックス遺伝子の特徴づけているTドメインはDNA結合能を担いTボックス遺伝子が機能する上で重要な働きをしている。Tドメインはファミリー間で高度に保存されている一方で、それ以外の領域ではほとんど相同性は見いだされない。Tボックス遺伝子の機能に関する蓄積は進んでくるにつれて、ファミリー間で機能の違い

がいかにしてもたらされるかという疑問に対する研究も注目されつつある(Sinha et al., 2000)。ニワトリでは*Tbx4*が後肢の、*Tbx5*が前肢の運命決定において鍵となる働きをすることが明らかにされているが、こうした例からも、それぞれの遺伝子が機能する上での特異性が何によってもたらされるかという問題を解決する必要性はますます高まっている。

Tボックス遺伝子間での機能の違いをもたらし要因としてまず大きく分けて2つの要因が考えられる。1つはTドメインの認識配列がファミリー間でも明確に異なっており、DNAとの結合段階で厳密にターゲット遺伝子の発現制御領域に結合し転写を促すというものであり、もう1つはTドメインによる配列認識は比較的曖昧なもので、たとえばTドメイン以外の部分と相互作用して働くような因子が存在しその集合体として配列の認識、あるいは転写の制御を行っているという可能性である。こうした可能性を検証するために、図21に示すような*HrBra*と*HrTbx6*のTドメインを入れ替えたキメラ遺伝子のmRNAを発現させ、発生に及ぼす影響を解析した。この際、GFPをC末側につなぎ顕微注入した胚でのタンパク質への翻訳を確認した(図22)。

4.3. キメラ遺伝子の胚発生に及ぼす影響

*HrBra*のTドメインに*HrTbx6*のC末側転写活性化領域をつないだキメラ(*Bra-Tbx6*)を発現させた場合には、初期尾芽胚期頃までは見た目上は正常な胚が形成されたが、その後尾部の伸張はみられなくなり、後期尾芽胚期頃になると脊索細胞に特徴的にみられる液胞化した細胞が異所的に形成されることが観察された(図23)。また、初期尾芽胚期の胚に関して脊索特異的Not-1抗体を用いて抗原を検出すると、*HrBra*の全長(*Bra-Bra*)を発現させた場合と同様に、異所的な発現が観察された(図24)。また、110細胞期以降サイトカラシンBにより卵割を阻害し初期尾芽胚期頃に固定し、抗体染色を行った胚でも同様の結果が得られた。一方で*HrTbx6*のTドメインに*HrBra*のC末側転写活性化領域をつないだキメラ(*Tbx6-Bra*)を発現させた場合に

は、Bra-Tbx6を発現させた場合のような脊索特異的抗体の異所的な発現は観察されなかった。

Tbx6-Braを発現させた場合には、原腸陥入は進むが神経胚期頃から発生に異常が見られた。また、尾芽胚期でも尾部の伸張は起こらなかった。110細胞期頃の胚を固定し*in situ*ハイブリダイゼーションにより筋肉特異的ミオシン重鎖遺伝子の発現を調べたところ、HrTbx6の全長(Tbx6-Tbx6)を発現させた場合と同様に、異所的な発現が観察された。こうした異所的な発現は発生の遅い時期でもやはり観察された(図25)。一方でBra-Tbx6の場合には、このような異所的な筋肉特異的遺伝子の発現は観察されなかった。また、筋肉特異的アクチン遺伝子に関しても同様の結果が得られた。

考察

1. *HrTbx6*の機能解析に関する考察

1.1. 分子系統学的解析に関して

本研究において作製した系統樹では、*HrTbx6*は*Tbx6*サブファミリーに属することを支持しているとは必ずしもいえない。また、これまでに示されている系統樹においても、*HrTbx6*(As-T2)の位置づけは曖昧な部分が多い(Smith, 1997; Papaioannou and Silver, 1998)。しかしながら、*HrTbx6*に限らず*Tbx6*サブファミリー遺伝子のTボックス遺伝子ファミリー内での系統学的位置づけにおいてはしばしば混乱がみられる。たとえば、マウス(Chapman et al., 1996)とゼブラフィシュ(Hug et al., 1997)の*Tbx6*は相同な発現パターンを示しており、機能面からも相同な遺伝子であると考えられる。しかしながら、今回作製した系統樹においても、これまでに報告されている系統樹においても、これら2つの遺伝子間の系統的位置関係には大きな隔たりがみられる。このような現象の説明として*Tbx6*サブファミリーの進化速度が速い可能性や、比較的最近になって置換が起こった可能性が指摘されている(Li, 1997; Ruvinsky et al., 2000)。

本研究の結果からホヤの*Tbx6*が筋肉の分化に深く関係していることが明らかになり、また、*HrTbx6*発現領域がマウスやゼブラフィシュの*Tbx6*遺伝子の発現領域とほぼ相同であることを考慮すれば、*HrTbx6*遺伝子はやはり*Tbx6*のサブファミリーに属するものであると考えてよさそうである。

1.2. 過剰発現の影響について

本研究により*HrTbx6*の過剰発現を行うと異所的に筋肉特異的遺伝子の発現が誘導され、*HrTbx6*の機能阻害を行うと筋肉特異的遺伝子の発現が抑制されることが

明らかになった。このことは、*HrTbx6*が筋肉の分化においてきわめて重要な働きをしていることを示している。また、*HrTbx6*の過剰発現胚では筋肉特異的遺伝子の異所的な発現は、動物極側の細胞で顕著にみられた。しかも、動物極側の細胞における表皮特異的遺伝子の発現は抑制されていた。このことから、*HrTbx6*が動物極側の細胞の発生運命を表皮から筋肉へ変えた可能性が示唆される。一方で植物極側の細胞では解析を行った限りにおいて筋肉特異的遺伝子の異所的な発現はみられなかった。この理由として、たとえば植物極側では、*HrTbx6*に対して抑制的に働きうる何らかの因子が存在する可能性が考えられる。*HrTbx6* mRNAの顕微注入による効果は量に依存していることから、顕微注入量を増やすことでこうした抑制を凌駕し、植物極側での異所的な筋肉特異的遺伝子の発現を誘導できるかもしれない。この可能性を検証するために、顕微注入する量をさらに増やし、合成mRNAの濃度を $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ まで上げ顕微注入を行ったが、この場合、発生のかかなり早い時期から異常が見られた。そのため110細胞期においてさえ正常胚との対応が不明瞭になり、どの細胞が植物極側の細胞であるかすら明らかにはできなくなってしまった。こうしたことから高濃度での顕微注入を行った胚における遺伝子発現の解析は困難であると思われる。もっとも、この場合、植物極側のほとんどすべての細胞の発生運命までが変えられてしまったために、正常胚との対応がつかない程度にまで発生が異常になってしまったとも考えられる。

1.3. *HrTbx6*の尾部先端での機能

マウスの*Tbx6*は沿軸中胚葉および尾芽で発現している。一見、中胚葉での発現はホヤでは筋肉細胞に相当し、尾芽での発現は尾部先端での発現に相当するかのように見える。しかし、マウスの尾芽は未分化の細胞を含んだ領域で、体軸の伸張などに関わっているのに対し、ホヤの尾部先端は単なる表皮細胞である。従って、*HrTbx6*が尾部先端において何らかの機能を担っているとしても、マウスの*Tbx6*の

尾芽における機能とは異なっている可能性が高いと思われる。今回の結果からは *HrTbx6* の尾部先端での発現に重要な機能は見出せなかったが、この領域での発現は比較的発生の後期、すなわち神経胚期以降においてみられることから、神経胚期以降では何らかの機能を持っている可能性も考えられる。受精卵への顕微注入では筋肉形成の機能が発現し表皮細胞のほとんどすべてを筋肉細胞に変えてしまうので、後期での発現の意味を考えることは困難であると思われる。

2. 転写制御領域の解析に関する考察

2.1. 転写制御領域に含まれるモジュール

本研究の結果から *HrTbx6* の転写制御領域は2つの領域、尾部先端の表皮細胞での発現を担う領域および筋肉細胞での発現を担う領域からなることが明らかになった(図5B)。また、筋肉細胞での発現を制御すると考えられる領域のすぐ上流側にTドメインの結合コンセンサス配列と非常によく似た配列が存在し、この配列を含む領域と *HrTbx6* mRNA の共注入を行うと異所的なレポーター遺伝子の発現が誘導された。一方で、結合配列を含まない上流域と *HrTbx6* mRNA の共注入では異所的なレポーター遺伝子の発現はみられなかった。このことから *HrTbx6* の転写制御においてはそれ自身の転写活性化が関与している可能性が示唆される。Tドメインの結合配列は尾部先端での発現にも関わっている可能性も考えられるが、*HrTbx6* の異所的な発現が筋肉細胞への分化を誘導するという結果から、発生における意味合いという点では筋肉細胞でのオートレギュレーションの方が重要であろう。また、ホヤでは遺伝子の転写制御領域は5'上流域のすぐ近傍にみられることが多いことから、転写制御のためのモジュールは比較的コンパクトにまとまっていると考えてよさそうである。こうした点からもTドメインの結合配列は筋肉細胞でのオートレギュレーションに、

より深く関わっていると考えられる。

2.2. 筋肉での発現を担う領域

筋肉細胞での発現がもっとも明瞭にみられるのは-230bpの場合であり、およそ57%の胚で筋肉細胞にのみレポーター遺伝子の発現がみられ、異所的な発現を伴うものも含めると約98%の胚で筋肉細胞におけるレポーター遺伝子の発現が認められた。一方で、-140bp、-104bpの5'上流域の場合にも筋肉での発現は認められたが、-140bpの場合には、筋肉細胞でのレポーター遺伝子の発現がみられた胚は異所的な発現を伴うものを含めても約42%であった。-104bpの場合には発現の特異性が低下し、筋肉細胞での発現がみられた約33%の胚のすべてが異所的な発現を伴っていた。このことから、-230bpから-140bpの間にも何らかの重要な役割があると考えられる。一方で、-50bpでは全く発現がみられなかったことから、-230bpから-50bpまでの領域が筋肉での特異的な発現を担うシスエレメントが含むと考えられる。シスエレメントをさらに明確にするためには3'側から削ったコンストラクトでの解析が必要である。

2.3. 尾部先端での発現を担う領域

今回の実験結果から、尾部先端での発現は-2164から-1754bpの領域のよって制御されていると考えられる。尾部先端での発現解析に用いたコンストラクトの中では-1754bpより短いものに関しては全く発現がみられなかった。しかし、もっとも短いコンストラクト、すなわち-1154bpから-555bpの上流域に関しては約75%の胚でレポーターの発現が観察された。図11では凡例に従った分類で発現領域を示したが、実際の発現は、ほぼランダムなものであった。このことから、この領域に何らかの転写活性化に関わる配列が存在する可能性も示唆されるが、発現の特異性との関係はないと考えられる。

2.4. Tドメインの認識配列

T_dおよびT_pそれぞれを削った場合の結果から、HrTbx6によるそれ自身の転写活性化においてはT_pがより重要な働きを担っていると考えられる。T_dとT_pの違いは10bpのうちの1bpのみである。しかも両者とも、X線による結晶構造の解析結果からTドメインとDNAとの間での直接的な接触に必要とされる部分(5'-NNTNNCACN N-3')を持つ。こうしたことから両者の役割の違いは配列以外の要因によるものかもしれない。たとえば、Erives and Levine (2000)はカタユウレイボヤの筋肉細胞で発現する遺伝子*snail*やマボヤ筋肉特異的アクチン、ミオシン重鎖遺伝子上流域においてTドメインの結合配列によく似た配列が存在し、かつその近傍にEボックス(CANNTG)が存在することから、Tボックス遺伝子とbHLHタイプの遺伝子が協調的に働いている可能性を提示している。T_dとT_pの違いもこうしたほかの転写因子との関係によるものであるかもしれない。しかしHrTbx6の上流域に関してはEボックスは存在するが、T_dとT_pのちょうど間にあるのでこれだけの理由では説明がつきそうにない。

HrTbx6の転写制御領域は、特に筋肉細胞での発現に関していえば、2つの段階からなると考えられる。つまり、まず-230bpから-50bpの領域に何らかの因子が結合することで転写が開始され、ひとたびHrTbx6タンパク質が出来始めるとそれらがHrTbx6上流のTドメイン結合配列に結合しそれ自身の転写活性を維持する、という機構が考えられる。HrBraに関して、5'上流の転写制御領域にTドメインの結合配列が存在し、この配列にHrBraタンパク質が結合し、それ自身のオートレギュレーションに関わっていることが示されている。もし、HrBraタンパク質およびHrTbx6タンパク質が同じ配列を認識して機能するならば、HrTbx6の過剰発現によってHrBraの発現が誘導されるということが起こりうる。しかし、本研究での結果はこ

の可能性を否定している。また、*HrTbx6*の上流域-351bpと*HrTbx6* mRNAとの共発現を行うと異所的なレポーター遺伝子の発現が観察されたのに対し、*HrBra* mRNAとの共発現では異所的なレポーター遺伝子の発現は認められなかった。これらの結果から2つの可能性が考えられる。一つは*HrBra*および*HrTbx6*のTドメインによる認識配列が両者の間で明確に区別されている可能性、もう一つは*HrBra*タンパク質が*HrTbx6*の上流に結合しても転写活性を示さない可能性である。実際、異なるTボックス遺伝子が同じ配列に結合しながらも、異なる転写活性を示す例も報告されている(Sinha et al., 2000)。しかしながら、キメラ遺伝子を用いた実験の結果はTドメインによる認識配列が異なっている可能性を支持している。

2.5. *HrTbx6*の筋肉分化遺伝子カスケードにおける位置づけ

*HrMA4*および*HrMHC*の5'上流域にはTドメインの結合配列とよく似た配列が存在しこの配列に*HrTbx6*が直接的に結合することで、これらの筋肉特異的遺伝子の発現を活性化する可能性が考えられた。しかしながら、*HrMA4*および*HrMHC*の5'上流域からTドメインの結合配列だけを削ったコンストラクトと*HrTbx6* mRNAの共注入を行った場合にもレポーター遺伝子の転写が活性化された。このことから、異所的に発現した*HrTbx6*がほかの筋肉分化に関わる遺伝子の転写を活性化し、その結果として間接的に*HrMA4*や*HrMHC*といった筋肉特異的遺伝子の発現が活性化されたと考えられる。一方で、Tドメインを含む上流域を顕微注入した場合のレポーター遺伝子の発現は、Tドメインを削った上流域を顕微注入した場合のレポーター遺伝子の発現に比べて、明らかに強く活性化されていることが観察された(図15、16)。このことから*HrTbx6*が直接的に*HrMA4*および*HrMHC*の5'上流域に結合して転写の活性化を行っている可能性が示唆される。これらの結果から考えられる筋肉分化に関わる遺伝子のカスケードの模式図を図17に示した。まず母性に存在するによって*HrTbx6*の転写が活性化されさらに*HrTbx6*タンパク質により*HrMA4*や*HrMHC*と

いった筋肉特異的構造遺伝子や*HrMD1*などの筋肉分化に関わる転写因子の発現を活性化すると考えられる。母性に存在するmRNAあるいはタンパク質は直接的に*HrTbx6*以外の筋肉分化に関わる転写因子や構造遺伝子の転写を活性化している可能性もあると考えられるが、*HrTbx6*の機能が阻害されると筋肉分化が抑制されるという結果から、筋肉分化においては*HrTbx6*の発現がひとつの大きな引き金になっていると考えられる。

3. *Tbx6*のターゲット遺伝子の解析に関する考察

*Ci-Tbx6*の過剰発現胚と機能阻害胚とのサブトラクションライブラリーを作製し、このライブラリーに含まれる約200クローンについて5'末端および3'末端の塩基配列の決定を行った。その結果、互いに独立であると考えられるクローンは144含まれていた。これらのクローンに対して相同性解析を行ったところ、意外にもアクチンやミオシンといった筋肉細胞に見られる構造遺伝子はあまり含まれていなかった。そのほかでは、Znフィンガーモチーフを持つ転写因子、解糖系に関わる酵素あるいはイオンチャネルを構成するタンパク質をコードする遺伝子などが含まれていた。今後、これらの遺伝子に関して*in situ*ハイブリダイゼーション法によって発現解析を行い、筋肉細胞で発現がみられる遺伝子を中心に転写制御領域の解析を進める必要がある。また、サブトラクションによって得られた遺伝子が、実際に過剰発現胚では発現が上昇しているのかどうか、ドットプロット法による解析も行わねばならない。

4. 機能ドメインの解析に関する考察

4.1. C末側の転写活性化について

HrTbx6に関してはC末側全体での場合に強い転写活性がみられたが、HrBraに関してはC末側が転写活性化領域を含むものの全体での転写活性はみられなかった。また、栄養要求性を指標として転写活性を調べたところ、HrBraのC末側全体でも弱いながら転写活性がみられた。こうしたことから実際の働きとしてHrBraのC末側全体にも転写活性はあるのかもしれない。また、別の可能性としてC末側に転写を抑制するように働く領域が含まれているのかもしれない。

4.2. Tドメインによる特異性の決定

*Bra-Tbx6*のキメラを胚で発現させると異所的に脊索特異的抗体による抗原が検出されることから、異所的に脊索細胞が形成された可能性が示唆される。また、*Tbx6-Bra*のキメラを発現させた場合には異所的に筋肉特異的遺伝子の発現が観察されることから、異所的に筋肉細胞が形成された可能性が示唆される。つまり、キメラ遺伝子の機能はそれが持つTドメインの特異性によって決定されている可能性が示唆される。しかしながら、いずれのキメラの場合にも、野生型遺伝子の場合と比べると引き起こされる表現型やマーカー遺伝子の異所的発現の度合いは低くなっている。このことから、Tドメインによって機能の特異性が決定されるとしてもやはりそれだけでは十分でないと言える。Hsueh et al. (2000)はTbr-1とCASKが相互作用し協調的に働くことで転写活性を大幅に上昇させると報告しており、Tドメイン以外の部分（特にC末側）が単に転写活性化だけに働いているのではなくほかの何らかの因子と相互作用しその結果として転写活性の強さやあるいは時期を細かく制御しているの可能性も考えられる。

こうしたことを考え合わせると、HrBraおよびHrTbx6それぞれの結合配列の

明確な違いを明らかにし、同時にそれぞれのタンパク質と相互作用する因子を単離、解析することによってはじめて機能の特異性が明らかにされるものと考えられる。

本研究によって、HrBraおよびHrTbx6の機能の特異性がもたらされるメカニズムの輪郭は描き出されたものと思われる。しかしながら、ホヤ以外の種において同様のメカニズムによって特異性が決定されているかどうかは全く不明である。また、Tボックス遺伝子以外のファミリーをなす遺伝子群に関してもいくつかの報告がある。たとえばホメオドメインを持つタンパク質AbdAおよびUbxを用いて機能ドメインを解析した例があるが(Chauvet et al., 2000)、この場合DNA結合能を担うホメオドメインよりむしろそれ以外の領域が機能の特異性の決定において重要な役割を果たしているという報告がなされている。

謝辞

本研究を行うにあたって、マボヤの採集や飼育にご協力してくださった東北大学理学部附属浅虫臨海実験所ならびに東京大学海洋研究所大槌研究センターの皆さまに感謝いたします。カタユウレイボヤの採集に協力して下さった東北大学農学部附属海洋資源教育センター、東京大学理学部附属三崎臨海実験所ならびに京都大学農学部附属水産試験場の皆さまに感謝いたします。

本研究は主に京都大学大学院理学研究科動物学教室において行いましたが、実験技術の指導や有意義な議論をして下さいました分子・進化発生生物学研究室のみなさまならびに先輩方に感謝いたします。また、本学位申請に伴いさまざまな事務手続き上のサポートをして下さいました平山和子氏に感謝いたします。本研究の一部は基礎生物学研究所上野直人教授の研究室において行いました。研究室の一員として受け入れて下さった上野直人教授ならびに研究室のみなさまに感謝いたします。現在基礎生物学研究所助手の高橋弘樹博士には研究のみならず公私にわたって常に貴重な意見をいただきましたことに深く感謝いたします。

最後に、指導教官として、また共同研究者として、適切なご指導とご助言を下さり、さらに本稿に対しても精読と批判をして下さった、京都大学大学院理学研究科佐藤矩行教授に感謝いたします。

参考文献

- Araki, I., and Stoh, N. (1996) *cis*-regulatory elements conserved in the proximal promoter region of an ascidian embryonic muscle myosin heavy-chain gene. *Develop. Genes Evol.* **206**: 54-63.
- Cameron, C.B., Garey, J.R., and Swalla, B.J. (2000) Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **25**: 4469-74.
- Chapman, D.L., Agulnik, I., Hancock, S., Silver, L.M., and Paipaiouannou, V.E. (1996) *Tbx6*, a mouse T-box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev. Biol.* **180**: 534-542.
- Chapman, D.L., and Paipaiouannou, V.E. (1998) Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* **391**: 695-697.
- Chauvet, S., Merabet, S., Bilder, D., Scott, M.P., Pradel, J., and Graba, Y. (2000) Distinct hox protein sequences determine specificity in different tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **11**: 4064-4069.
- Clements, D., Taylor, H.C., Herrmann, B.G., and Stott, D. (1996) Distinct regulatory control of the *Brachyury* gene in axial and non-axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation. *Mech Dev.* **56**: 139-149.
- Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M., and Smith, J.C. (1996) Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm. *Development* **122**: 2427-2435.
- Corbo, J.C., Levine, M., and Zeller, R.W. (1997) Characterization of a notochord-specific enhancer from *Brachyury* promoter region of ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* **124**: 589-602.
- Di Gregorio, A., and Levine, M. (1998) Ascidian embryogenesis and the origins of the chordate body plan. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 457-463.

- Di Gregorio, A., and Levine, M. (1999) Regulation of *Ci-tropomyosin-like*, a Brachyury target gene in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* **126**: 5599-5609.
- Erives, A., and Levine, M. (2000) Characterization of a maternal T-Box gene in *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* **225**: 169-78.
- Griffin, K.J.P., Amacher, S.L., Kimmel, C.B., and Kimelman, D. (1998) Molecular identification of *spadetail*: regulation of zebrafish trunk and tail mesoderm formation by T-box genes. *Development* **125**: 3379-3388.
- Herrmann, B.G., and Kispert, A. (1994) The *T* genes in embryogenesis. *Trends Genet.* **10**: 280-286.
- Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R., and Lehrach, H. (1990) Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**: 617-622.
- Hikosaka, A., Kusakabe, T., and Satoh, N. (1994) Short upstream sequences associated with the muscle-specific expression of an actin gene in ascidian embryos. *Dev. Biol.* **166**: 763-769.
- Hotta, K., Takahashi, H., and Satoh, N. (1998) Expression of an ascidian gene in the tip of the tail of tail-bud-stage embryos. *Dev. Genes Evol.* **208**: 164-167.
- Hug, B., Walter, V., and Gruwald, D.J. (1997) *tbx6*, a *Brachyury*-related gene expressed by ventral mesodermal precursors in the zebrafish embryo. *Dev. Biol.* **183**: 61-73.
- Ishida, K., Ueki, T., and Satoh, N. (1996) Spatio-temporal expression patterns of eight epidermis-specific genes in the ascidian embryo. *Zool. Sci.* **13**: 699-709.
- Kimelman, D., and Griffin, K.J. (1998) Mesoderm induction: a postmodern view. *Cell* **94**: 419-21.

- Kispert, A., and Herrmann, B.G. (1993) The Brachyury gene encodes a novel DNA-binding protein. *EMBO J.* **12**: 3211-3220.
- Kispert, A., Herrmann, B.G., Leptin, M., and Reuter, R. (1994) Homologs of the mouse *Brachyury* gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev.* **8**: 2137-2150.
- Kispert, A., Ortner, H., Cooke, J., and Herrmann, B.G. (1995a) The chick *Brachyury* gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. *Dev. Biol.* **168**: 406-415.
- Kispert, A., Koschorz, B., and Herrmann, B.G. (1995b) The T protein encoded by *Brachyury* is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J.* **14**: 4763-4772.
- Knezevic, V., De Santo, R., and Mackem, S. (1997) Two novel chick T-box genes related to mouse Brachyury are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development* **124**: 411-419.
- Kusakabe, T., Suzuki, J., Saiga, H., Jeffery, W.R., Makabe, K.W., and Satoh, N. (1991) Temporal and spatial expression of a muscle actin gene during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* **33**: 227-234.
- Kusakabe, T., Makabe, K.W., and Satoh, N. (1992) Tunicate muscle actin genes: structure and organization as a gene cluster. *J.Mol. Biol.* **227**: 955-960.
- Lemaire, P., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (1995) Expression cloning of *Siamois*, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* **81**: 85-94.
- Li, W.H. (1997) *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Mitani, Y., Takahashi, H., and Satoh, N. (1999) An ascidian T-box gene As-T2 is related to the Tbx6 subfamily and is associated with embryonic muscle cell differentiation. *Dev. Dyn.* **215**: 62-68.
- Müller, C.W., and Herrmann, B.G. (1997) Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the *Brachyury* transcription factor. *Nature* **389**: 884-888.
- Nishida, H. (1987) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* **121**: 526-541.
- Nishikata, T., and Satoh, N. (1990) Specification of notochord cells in the ascidian embryo analysed with a specific monoclonal antibody. *Cell Differ Dev* **30**: 43-53.
- O'Reilly, M.-A. J., Smith, J. C., and Cunliffe, V. (1995) Patterning of the mesoderm in *Xenopus*: dose-dependent and synergistic effects of *Brachyury* and *Pintallavis*. *Development* **121**: 1351-1359.
- Papaioannou, V.E., and Silver, L.M. (1998) The T-box gene family. *BioEssays* **20**: 9-19.
- Pflugfelder, G.O., Roth, H., and Poeck, B. (1992) A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse *Brachyury* is involved in DNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 918-925.
- Satoh, N. (1994) "*Developmental Biology of Ascidians*." New York: Cambridge University Press.
- Satoh, N. (1998) Cell fate determination in the ascidian embryo. In: "*Cell Lineage and Fate Determination*," Moody, S.A. (ed). San Diego: Academic Press, pp.59-74.

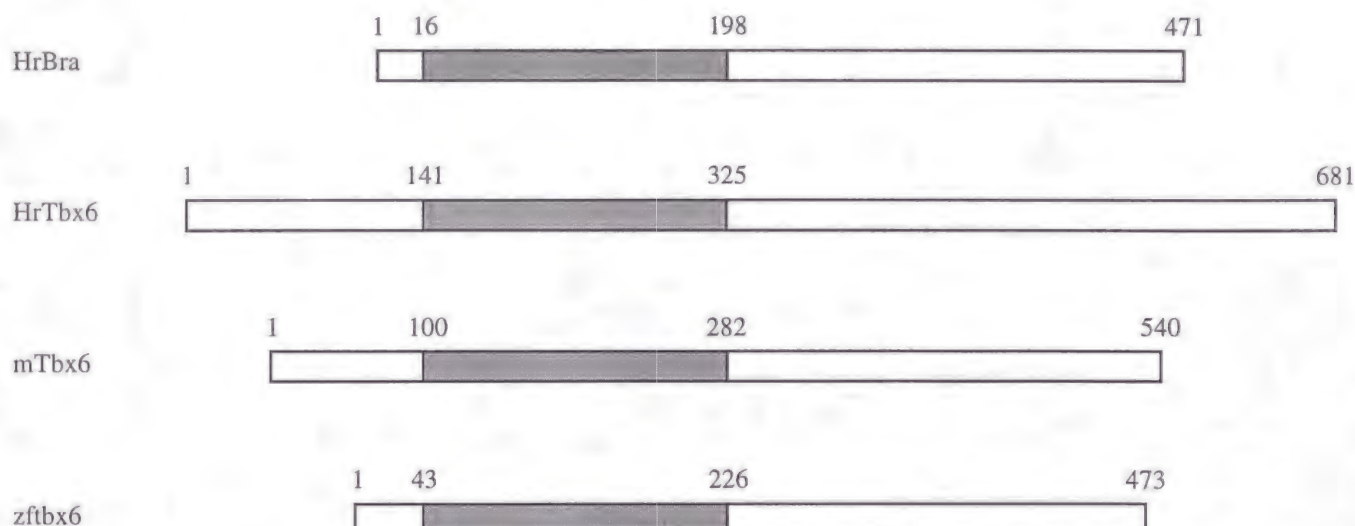
- Satou, Y., Kusakabe, T., Araki, I., and Satoh, N. (1995) Timing of initiation of muscle-specific gene expression in the ascidian embryo precedes that of developmental fate restriction in lineage cells. *Dev. Growth. Differ.* **37**: 319-327.
- Satou, Y., and Satoh, N. (1999) Development gene activities in ascidian embryos. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 542-547.
- Schlte-merker, S., Ho, R.K., Herrmann, B.G., and Nusslein-Volhard, C. (1992) The protein product of the zebrafish homolog of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* **116**: 1021-1032.
- Sinha, S., Abraham, S., Gronostajski, R.M., and Campbell, C.E. (2000) Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2. *Gene* **258**: 15-29.
- Smith, J. (1997) *Brachyury* and T-box genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:474-480.
- Smith, J. (1999) T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet.* **15**: 154-158.
- Smith, J.C., Price, B.M.J., Green, J.B.A., Weigel, D., and Herrmann, B.G. (1991) Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury* (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* **67**: 79-87.
- Suzabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L.H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**: 655-669.
- Takahashi, H., Ishida, K., Makabe, K.W., and Satoh, N. (1997) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed in the tail region of the ascidian tailbud embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **41**: 691-698.

- Takahashi, H., Hotta, K., Erives, A., Di Gregorio, A., Zeller, R.W., Levine, M., and Satoh, N. (1999a) *Brachyury* downstream notochord differentiation in the ascidian embryo. *Genes Dev.* **13**: 1519-1523.
- Takahashi, H., Mitani, Y., Satoh, G., and satoh, N. (1999b) Evolutionary alterations of the minimal promoter for notochord-specific *Brachyury* expression in ascidian embryos. *Development* **126**: 3725-3734.
- Ueki, T., Makabe, K.W., and Satoh, N. (1991) Isolation of cDNA clones for epidermis-specific genes of the ascidian embryo. *Dev. Growth Differ.* **33**: 579- 586.
- Yasuo, H., and Satoh, N. (1993) Function of vertebrate *T* gene. *Nature* **364**: 582- 583.
- Yasuo, H., Satoh, N. (1994) An ascidian homolog of the mouse *Brachyury* (*T*) gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. *Dev. Growth. Differ.* **36**: 9-18.
- Yasuo, H., Kobayashi, M., Shimauchi, Y., and Satoh, N. (1996) The ascidian genome contains another T-domain gene that is expressed in differentiating muscle and the tip of the tail of the embryo. *Dev. Biol.* **180**: 773-779.
- Yasuo, H., and Satoh, N. (1998) Conservation of the developmental role of *Brachyury* in notochord formation in a urochordate, the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Biol.* **200**: 158-170.
- Wada, H., and Satoh, N. (1994) Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 1801-1804.
- Xanthos, J.B., Kofron, M., Wylie, C., and Heasman, J. (2001) Maternal *VegT* is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* **128**: 167-180.

- Zhang, J., and King, M.L. (1996) *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesoderm patterning. *Development* **122**: 4119-4129.
- Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1998) The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* **94**: 515-524.

図と表

A



B

HrBra 16: RLTLNDRALWTKFCSLTNEMIVTKSGRRMFVVLKLTASGLEPNSMYSFLLDFAPADSNRW 75
HrTbx6 141: QVQLCDKELWDQFSRAGTEMIIVTKTGRRMFPGYRIKISGLOPTAKYCVMLDIVNVDDHRY 200
mTbx6 100: -----LWKEFSAVGTEMIITKAGRRMFACRVSVTGLDPEARYLFLLDVVPVDGARY 151
zftbx6 43: -----LWDKFSSIGTEMLITKSGRRMFPSCKVTVTGLNPKVKYVVMIMVFPDNHXY 94

HrBra 76: KYVNGEWVPGGKPEPHAASCVYVHPDSPNFGSHWMKQPVVSFNKVKLTN-KGNGGGQQIML 134
HrTbx6 201: KFQHGIEWVAGRGEPLPQRFLLHPNSPANGSKWMSEIISFHKVKLTNSIGRDVDGKIVL 260
mTbx6 152: RWQGPDWEPGKAEPRLPDRVYIHPDSPATGAHWMRQPVVSFHRVKLTN-STLDPHGHLL 210
zftbx6 95: KWNKDCWEVNGSSDPHLNRRFFIHPDSPAPGQKWMQYPISEFKLKLTN-NTLNSNGLVVL 153

HrBra 135: NSLHKYEPRILH-V-VKVGGEAASERTIATFSFPESQFIATAYQNEEVTSCLKIKHNPF 192
HrTbx6 261: NSMHRVQPRVHIV-RTDDISSVHMQRQLCTFAFPQTVFITVTAYQNSEVTKLKIDNNPF 319
mTbx6 211: HSMHKYQPRILHLVRATQLCSQH-WGGVASFRFPETTFISVTAYQNPRITQLKIAANPF 269
zftbx6 154: HSMHKYQPRILHIVQSPDPCTPHNPGAYLRFTFPEAAFIATAYONQEITKLKIDNNPF 213

HrBra	193: AFLDAK-----	198	39%
HrTbx6	320: GFREDG-----	325	100%
mTbx6	270: GFRENGRNCKRER	282	46%
zftbx6	214: GFRDNGLNRKRFR	226	44%

図1 (A)HrBra、HrTbx6、mTbx6およびzftbx6タンパク質の模式図。Tドメインと予想される領域を網掛けで示した。(B)各タンパク質のTドメイン内のアミノ酸配列の比較。3つ以上のタンパク質について相同な場合には白黒反転で示した。また、右下に示した数字は各タンパク質とHrTbx6との間で保存されているアミノ酸数の割合である。

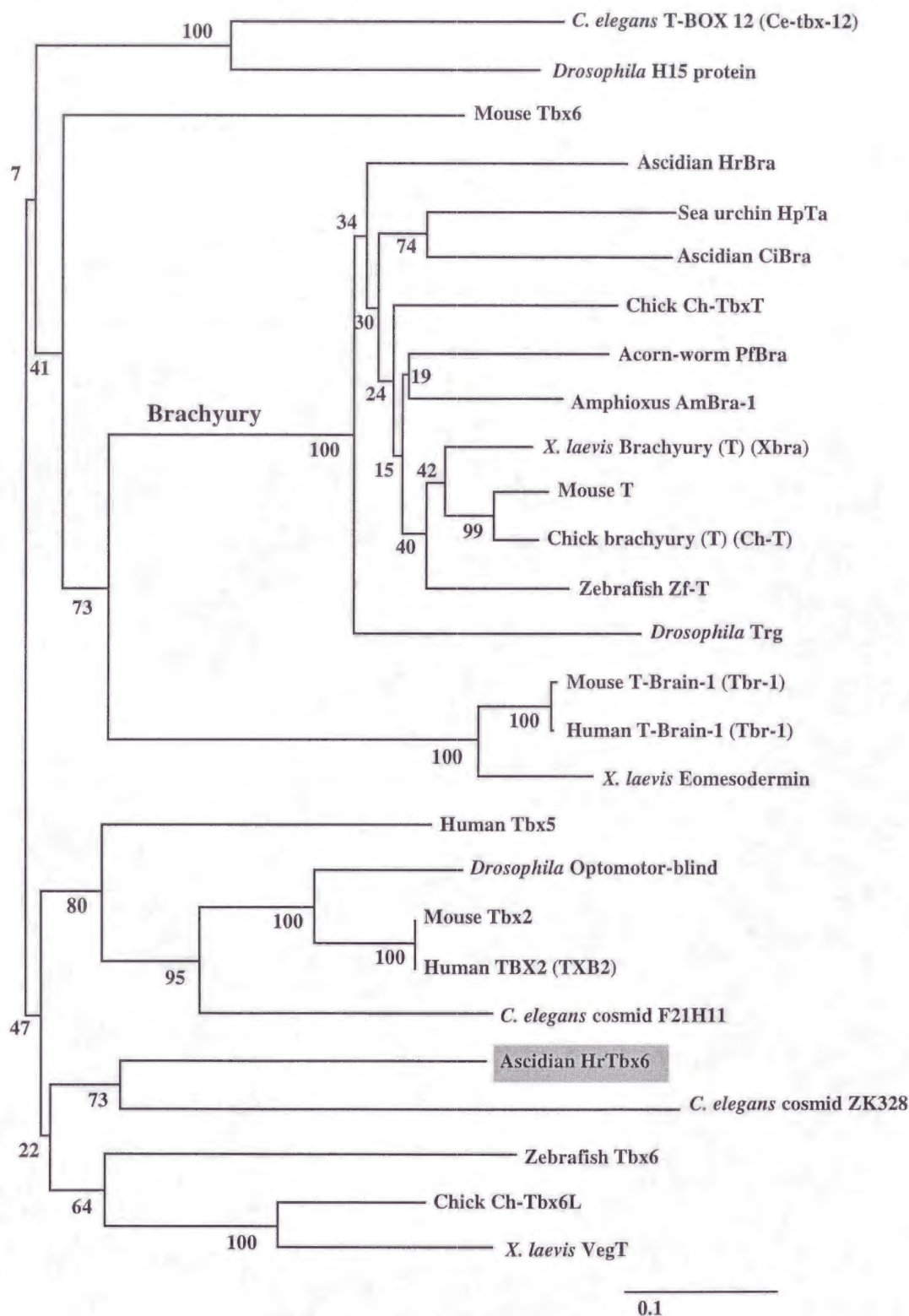


図2 Tドメインのアミノ酸配列をもとに近隣結合法によって作製した系統樹。0.1アミノ酸置換は右下のスケールバーの長さに対応する。枝分かれに示した数字はブートストラップ検定値である。

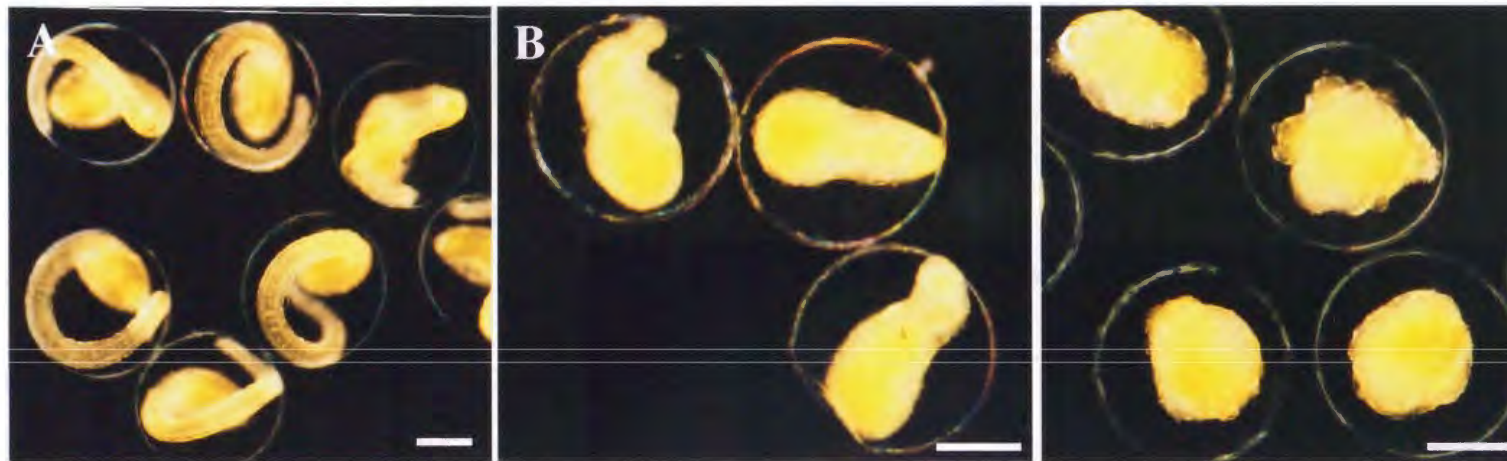


図3 *HrTbx6* mRNAを顕微注入した胚の表現型。(A)*lacZ* mRNAを顕微注入したコントロール胚。(B)0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6* mRNAを顕微注入した胚の表現型。(C)0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6* mRNAを顕微注入した胚の表現型。いずれも後期尾芽胚期頃。スケールバーはいずれも100 μm 。

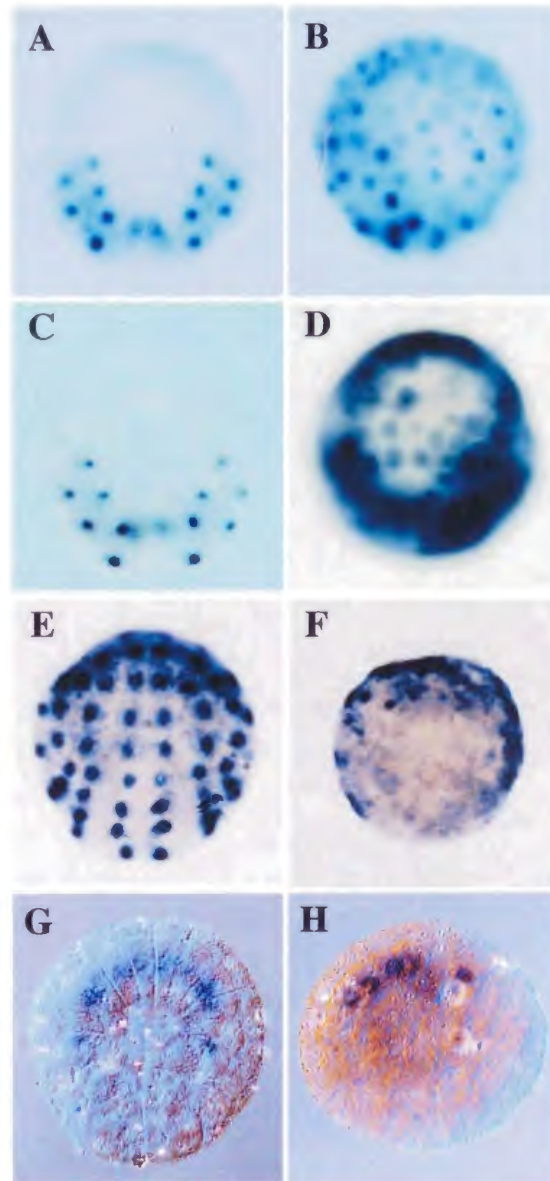


図4 (A,C,E,G)*lacZ* mRNAを顕微注入した胚の*in situ*ハイブリダイゼーション。(B,D,F,G)0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6* mRNAを顕微注入した胚の*in situ*ハイブリダイゼーション。(A,B)筋肉特異的アクチン遺伝子(*HrMA4*)の発現。(C,D)筋肉特異的ミオシン重鎖遺伝子(*HrMHC*)の発現。(E,F)表皮特異的遺伝子(*HrEpic*)の発現。(G,H)脊索特異的Tボックス遺伝子(*HrBra*)の発現。いずれも110細胞期あるいはその近辺の時期の胚。

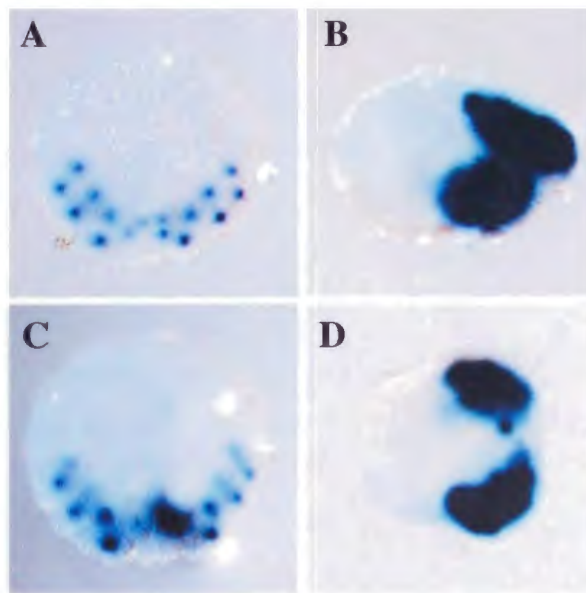


図5 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6-En* mRNAを顕微注入した胚における*in situ*ハイブリダイゼーション。(A,C)110細胞期、(C,D)中期尾芽胚期。(A,B)筋肉特異的アクチン遺伝子(*HrMA4*)の発現。(C,D)筋肉特異的ミオシン重鎖遺伝子(*HrMHC*)の発現。尾芽胚期では尾部が伸張せず発生に異常が見られるが、尾部と思われる領域でこれらの遺伝子の強い発現がみられる。

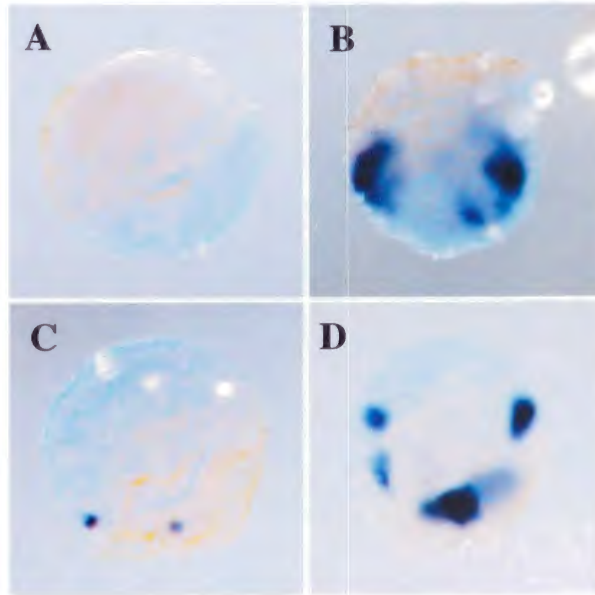


図6 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のHrTbx6-En mRNAを顕微注入した胚胚における*in situ*ハイブリダイゼーション。(A,C)110細胞期、(C,D)中期尾芽胚期。(A,B)筋肉特異的アクチン遺伝子(HrMA4)の発現。(C,D)筋肉特異的ミオシン重鎖遺伝子(HrMHC)の発現。110細胞期では多くとも2細胞でしか発現がみられない。また、尾芽胚期での発現は正常胚に比べると著しく弱い。

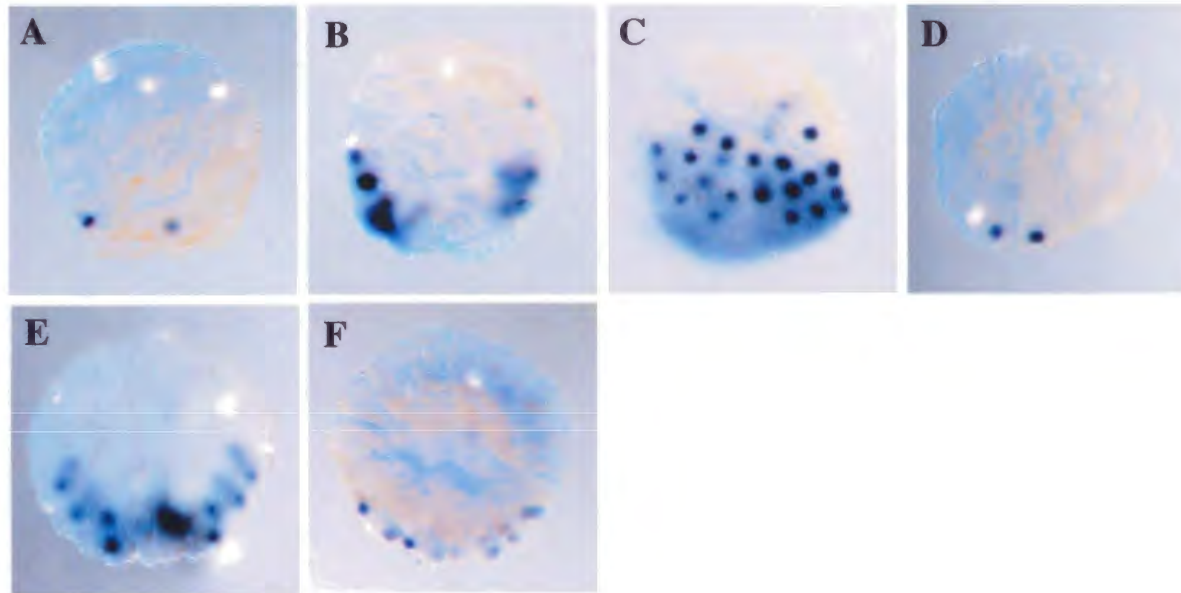


図7 *HrTbx6-En*と*HrTbx6*あるいは*HrBra*を共発現させた胚における*in situ*ハイブリダイゼーション。(A)0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6-En*のみ、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6-En*と(B)0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6*、(C)0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6*、(D)0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrBra*をそれぞれ顕微注入した胚。(E)0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6-En*のみ、(F)0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrTbx6-En*と0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の*HrBra*をそれぞれ顕微注入した胚。いずれも110細胞期胚におけるミオシン重鎖遺伝子の発現。

A

-2164
 AGCTTGACATATTCACGTATTTGAGGTTACAAACATCTCAAATTTTCAGAGCTATTATTTTGAATACAGTGTATTTTATGAAGAGAATGT
 ATATAGCACCTCTTCTAATTTTCTATGTTATAAATCATGTCAATTCGAAGAAATATTTTATAGTTTGTAGAAAACGGCATAACACAATTTCT
 TGCATAACTTTAAAAAATATTTCTTCGAAAGATAGTTGCTTAATATTTTAAATCGGGAGTTAATTGCTTACATACGGCAATTAAATTTAA
 TAGCGATGATATCCGTTAAATCAAACAAGCACGGCAATTAACTGTTTGTATCGCCCTTGTTTGACAAGGGACGGCAACATGACGAGAAA
 GAGAATTTGTTAAAGATAATTGTTTGTATTTCCGTTACACGGCTTAATGAGCGAGTAATGACAACGCGCGATAACGATTTGATATTGACG
 AAAGCGTTTTGATTGGATGAAAAGAAGAAATTGCTCACACCGATGCTATTTACAAAAACAAATATATCCCGTGATTGAATGAAATATATT
 TATTATTTATATAATATTTCTTTGTAATATTTTTTACCATAGTAATAAATTCGTATTCTACTCGTATTCAAATAGAAATAAACGCGTT
 CTATTACACATTTATTTTAGAAGTAACCTTTGAATAAATTCGATGACCCTGTAATTTATCAGAAATCAGTCACTTTCAATCATTTCACTT
 GGACACCATTATTTATAATGATAATGCTGAAGGAATTAATATGTATTAGATAATTAATAATATAATAGGAAATATAACCACTGTTTCGAA
 TATTGTGAAGAGTGGTAAAAGGAATATAAAGAAGTTATATACATTTCTCCATTGGATACTTCTATGAGCTGAATGGGTGAGTAACGCAGG
 GAACCTTAACCTTCTTAGTTTCCAGTTTTTGAGAGCATCAAAACAAGAAACACGATTTGTAAATTTACAGATTATTCAAACACAGCGGTGA
 TATATTCCACCTGATCTATTGCAGTCATATACAATATCTTAGTTGTAGGTAACATTATACTAAAAAATCAATCGATTCTACACTGAACCT
 ACTCAACTTACCAAACGATCAATTATTAAGTGTTAAGATAAATTGTTTAGTTCCGTTCAAGGCTTACGTTACTAATTAGCTTAATGTTG
 TGTATATTGTTAATAGTAATTAACGGAACCTGCATACAGTGAGGGTATGCAATTGCGTATACTGTTCTCGATAAATTGTTATCCATGTAAT
 GTATGGATCTCTATCAATACTCAGATGCCGAATTAGATGATAAAGAGATTCACAAAAACATGTCTAGGTTGAAAGTGAAAAATATACAAA
 ATAGCTTTGCAAATGGAATGTGTGAGACAGTCTCGCCAAGGCGATAATTCAACTTTACAAACAGTTGTCAACATTGAACTAAATCGCA
 GTTTTTCCAACCGCTGCGCAAACAGAAAAAGAAAAGTAACCGAAATCTAACACGACTCGCTGGAGCAGCTGACAAAAATGCGCCTGTGA
 TGTACAGCGTAAATTTCTAATATGATAATCATGTTGATACTCCAGTTCCAGGCTTAGAAATTTTTGTTTCATTAAATATCATAATAAACT
 ATTGGGGACTAATCGCATTTCTCGGTCCAAGATTTTCAATATTTGAAACAGTCAACTCATTGCAACATGGATTCCATTCCAATGCAAC
 TAAACAAAGTTGCAAGATAAAACCGTATAGTACAATAAATGCTTGACCCAAGGTAATGTGATATTTAATATGTTGTATATTAATAAATAA
 GATTGAATATTTGCAACGAATCGCATGGTTAATATGACATTTTCACACTTCTTCCCTTCAAAAACTCAAATGCATTTTTGTTCAGTATA
 TTGTTTTGATATTGACCACACGTTTGTGTCCAAGTGTGAACGAATGCAATGAATACTATCTTGCTGCGTTTACCACGATAACAACTGC
 AACAAATAGAGATAAAGGGAGACCGCGCCTTATCTTCTCACCCCGGTGCTTAAACGAGCGAAAGGTTAAAGTAAAAATGAAACAATTAAAA
 ACAAGATCTCTTTTCGTCAATGCAAATGAGAAGAAAGAACTACATAAAGCGAGGATAGTTTCGGAAGTGAATCATTATCATTTAATTGC
 GTAGCCAAAAAGAAAGTAGCAACAATACATTTCTATCCTTGTTAGTAAGTCTCATTGCCATTAAAGAAATACAGCGAGTTGACAGCAACA
 GAATCACGAAACAATTTACGGAGTATCCCAAAGATAGTTTCCGCCGTAAGACAGCTATGTCAGCTTTTCTATCTCCGATATCGGAGGG
 M S A F P I S D I G G

B



図8 (A) *HrTbx6* の5'上流域-2156bpの全塩基配列。 *HrTbx6* cDNAの5'末端を+1としている。 *HrTbx6* の翻訳領域に対しては予想されるアミノ酸配列(11残基)を付記した。(B)本研究の結果から転写制御に関わると考えられる領域を模式的に示した。青は尾部先端での発現に関わると考えられる領域、赤は筋肉での発現に関わると考えられる領域。



図9 *HrTbx6*の上流域に*lacZ*をつないだコンストラクトを顕微注入した胚での*lacZ*の発現の検出。LacZ活性のある細胞で青色の発色がみられる。(A)-2164bpの上流域を顕微注入した胚。矢印は筋肉細胞での発現。矢頭は尾部先端表皮細胞での発現。(B)-351bpの上流域を顕微注入した胚での発現。(C)-2164から-555bpまでの上流域を顕微注入した胚での発現。

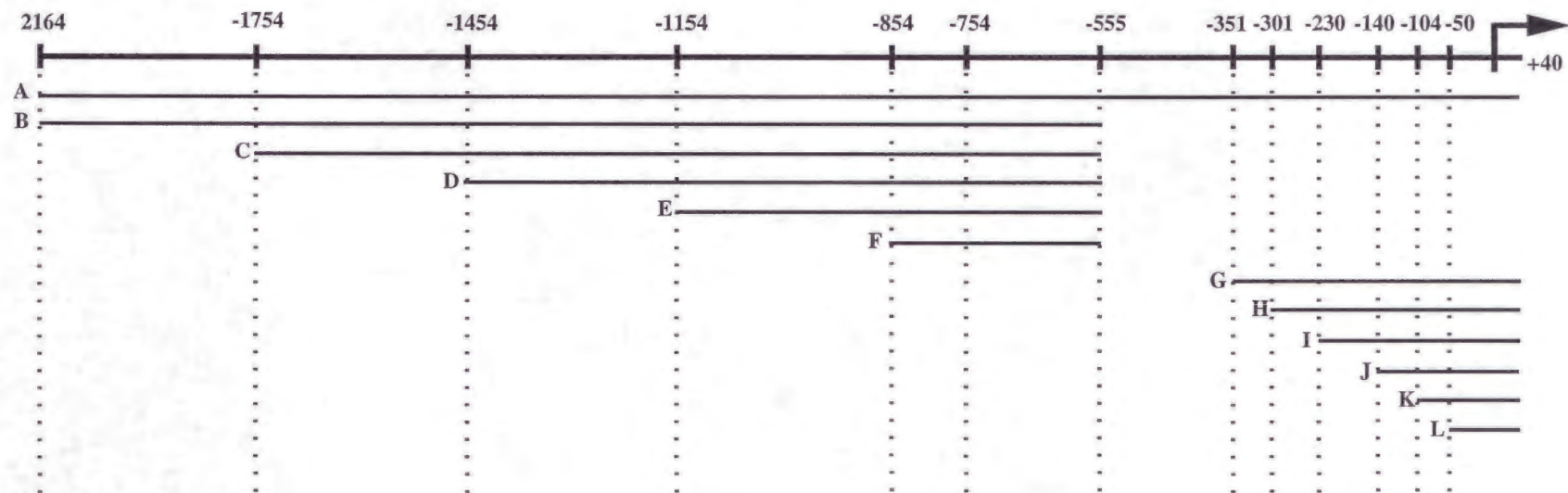


図10 *HrTbx6*の上流解析に用いたコンストラクトの模式図。

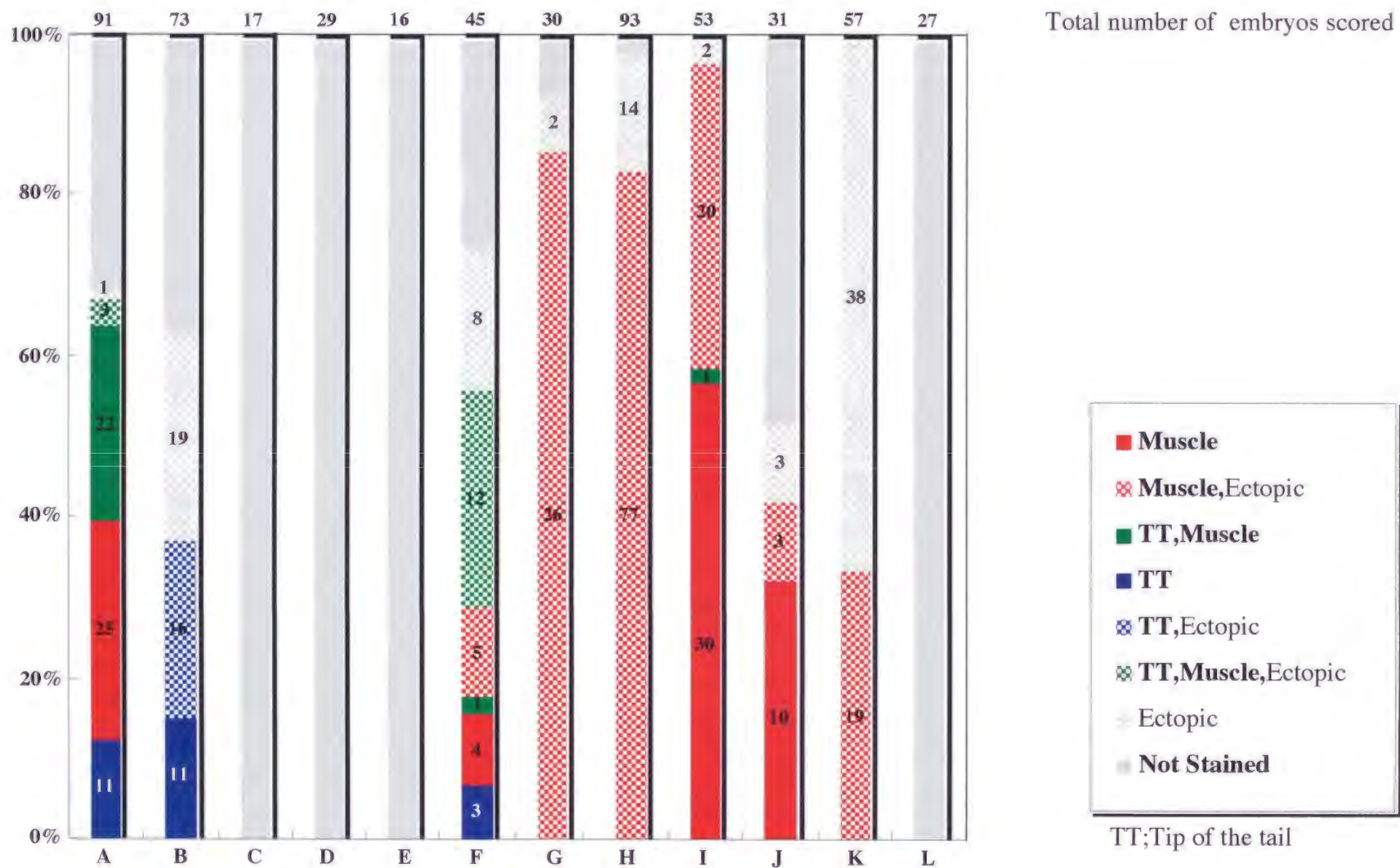


図11 各コンストラクトを顕微注入しレポーターの発現を解析した結果。表中の数字は胚の実数。

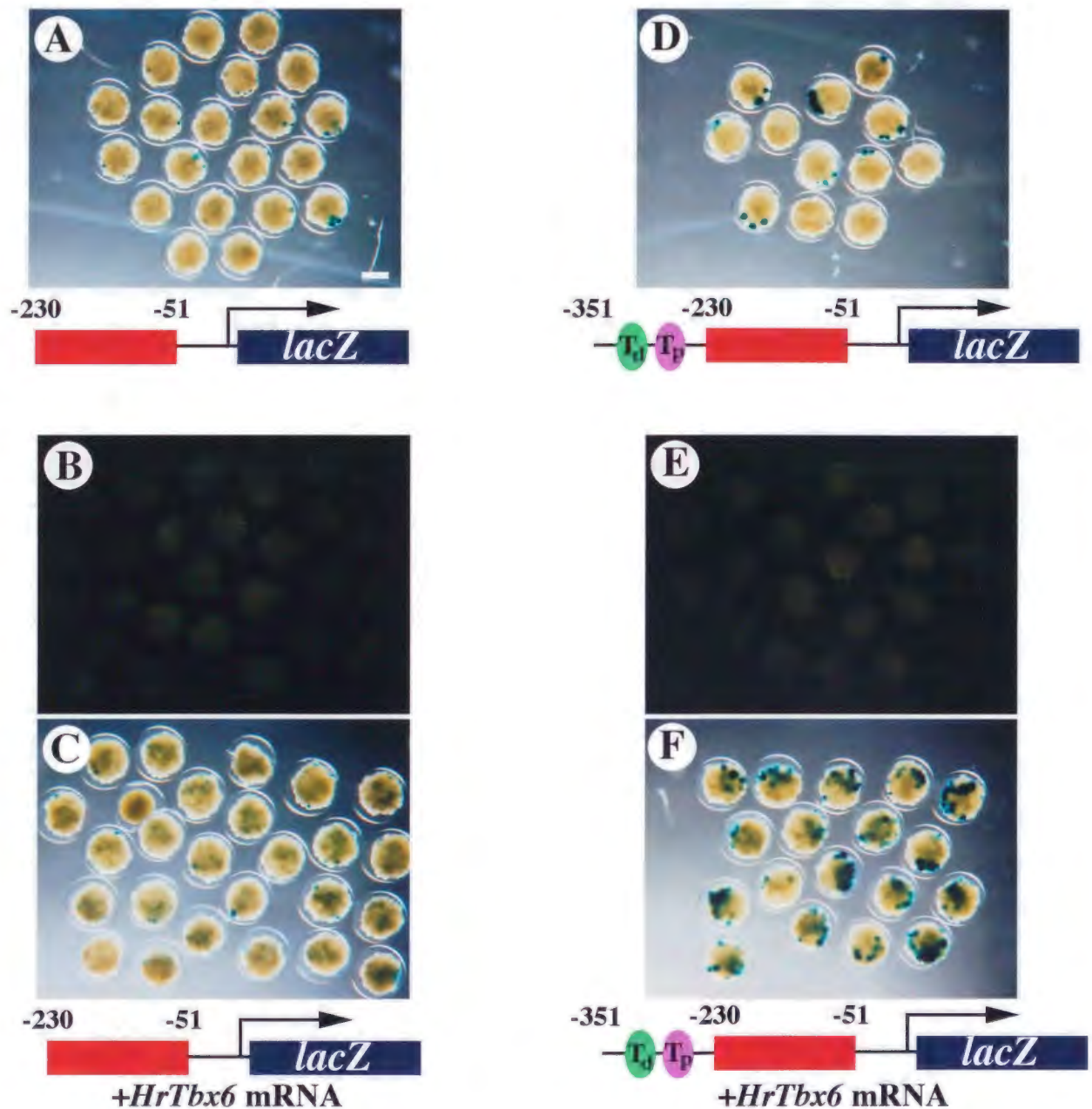


図12 *HrTbx6*の5'上流域に存在するTドメインの結合配列は*HrTbx6*遺伝子自身の転写を活性化する。(A)*HrTbx6*の5'上流域-230bpでのレポーター遺伝子の発現。(C)*HrTbx6*の5'上流域-230bpと*HrTbx6* mRNAを共注入した場合のレポーター遺伝子の発現。(D)*HrTbx6*の5'上流域-351bpでのレポーター遺伝子の発現。(F)*HrTbx6*の5'上流域-351bpと*HrTbx6* mRNAを共注入した場合のレポーター遺伝子の発現。異所的にレポーター遺伝子の発現が観察される。(B,E)GFPにより顕微注入した胚での*HrTbx6*が翻訳されていることを確認した。

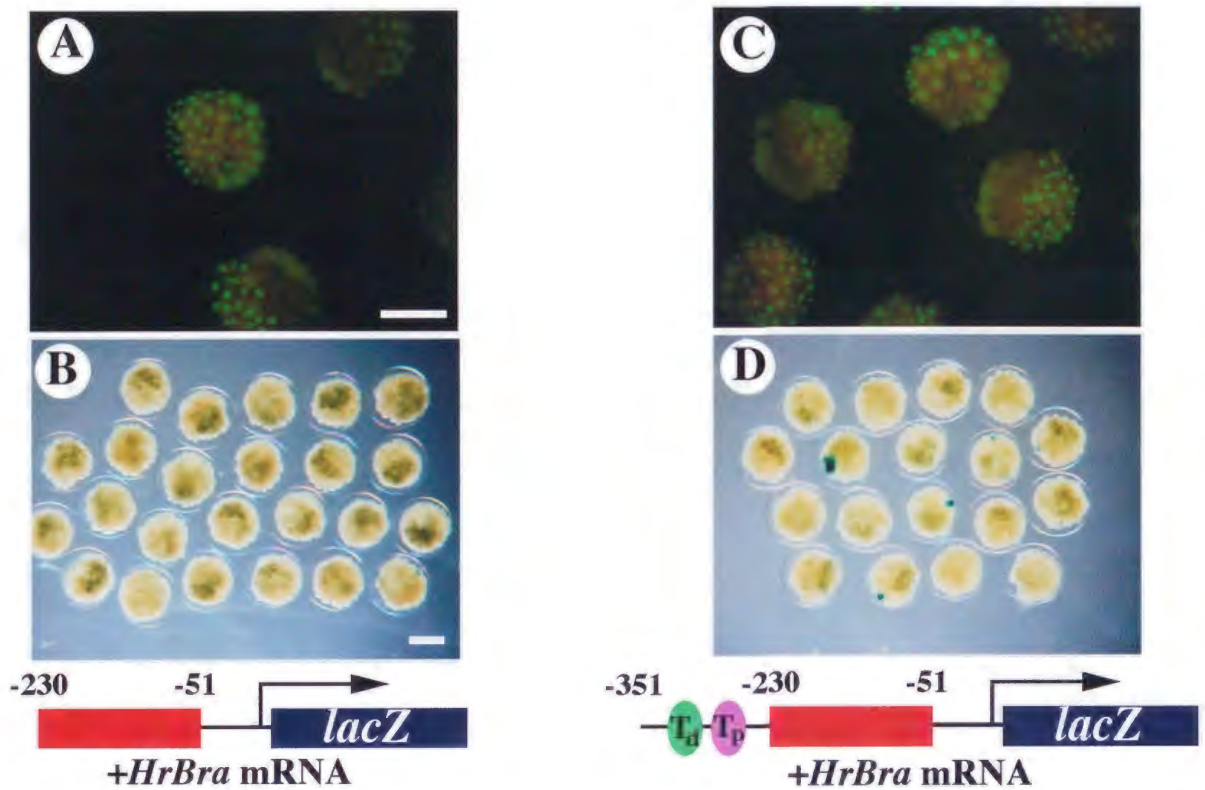


図13 *HrBra*は*HrTbx6*の転写を活性化しない。(B)*HrTbx6*の5'上流域-230bpと*HrBra* mRNAの共注入を行った胚におけるレポーター遺伝子の発現。(A,C)GFPにより顕微注入した胚での*HrBra*が翻訳されていることを確認した。(D)*HrTbx6*の5'上流域-351bpと*HrBra* mRNAの共注入を行った胚でのレポーター遺伝子の発現。異所的なレポーター遺伝子の発現は観察されない。スケールバーはそれぞれ100 μ m。

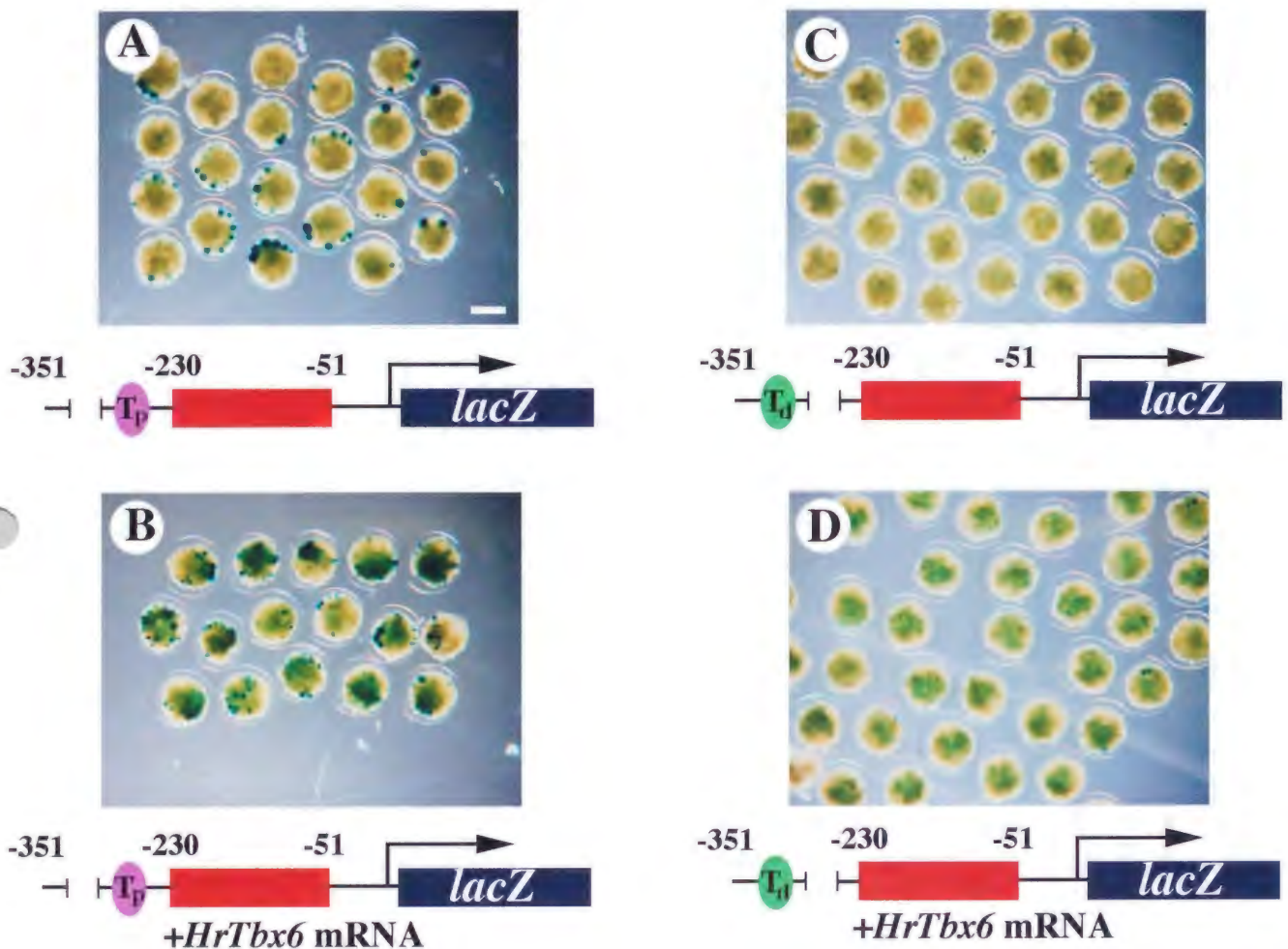
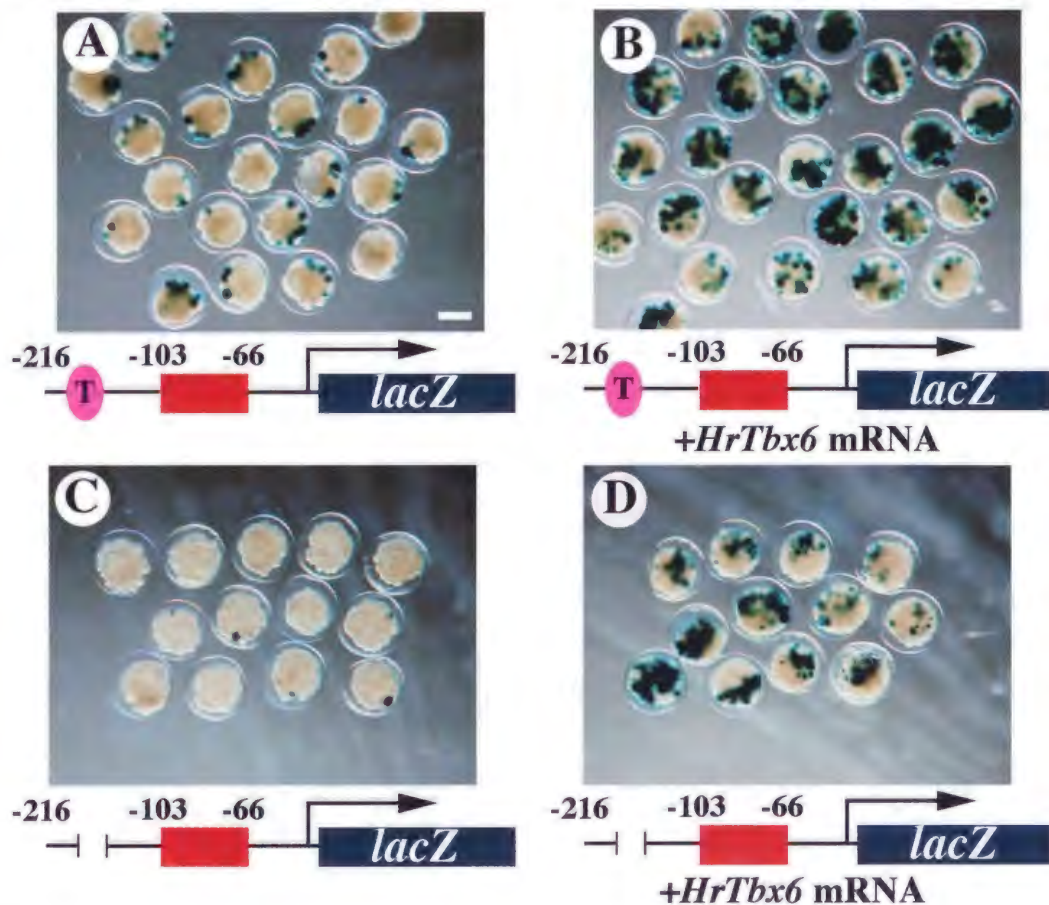


図14 Tドメイン結合コンセンサス配列と似た配列、T_dおよびT_pそれぞれを削り、*HrTbx6* mRNAを共注入した場合のレポーター遺伝子の発現。(A)T_dを削った上流域のみの場合。(B)T_dを削った上流域と*HrTbx6* mRNAを共注入した場合。(C)T_pを削った上流域のみの場合。(D)T_pを削った上流域と*HrTbx6* mRNAを共注入した場合。異所的な発現はみられない。発現細胞数の平均値；A：2.8(n=21)，B：6.6 (n=22)，C：1.0 (n=30)，D：0.5 (n=33)



E

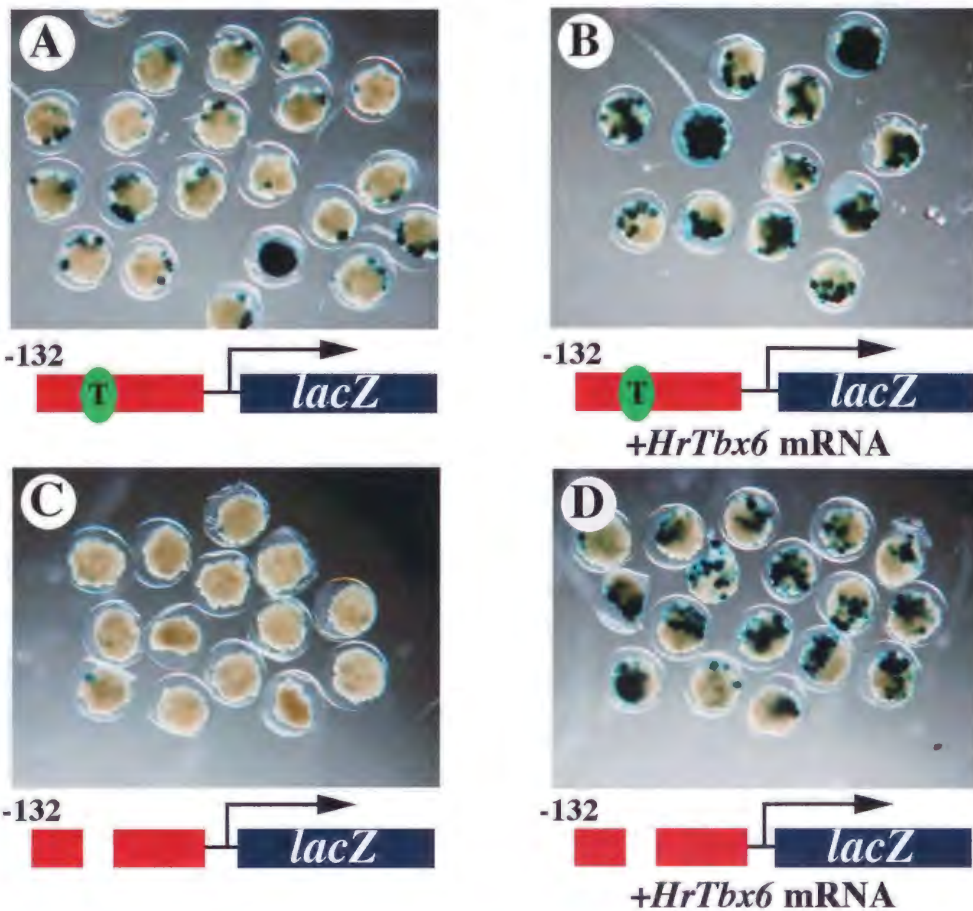
-216
 CTGTTATTACGACACCAAGGCCGCCCAAGTGTAGAACTCAATTG
 TTCGCACGTACCGCCAGTTGAACGATATATCCCACCATGCTATTC
 -103
 TTAAGTTACTCCTTTTATGGTCA⁺TCGCACTTCTCATTACGAATTG
 CGCGTGATAACAACGTGTCTTCATTTTTTCCGCTTTCCTCCGTTTC
 +1
 TTTCAGTATATAAGCCCTCTATCGTTTCGCTTATATTC⁺

T (Consensus) **TTTCACACCT**

HrMA4 **AAGTGTAGAA**
 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○

HrTbx6 (T_p) **GTTTCACACTT**

図15 (A)HrMA4の5'上流域-216bpを顕微注入した場合のレポーター遺伝子の発現。(B)HrMA4の5'上流域-216bpとHrTbx6 mRNAとの共注入を行った場合のレポーター遺伝子の発現。(C)Tドメイン結合配列を削ったHrMA4の5'上流域-216bpを顕微注入した場合のレポーター遺伝子の発現。(D)Tドメイン結合配列を削ったHrMA4の5'上流域-216bpとHrTbx6 mRNAとの共注入を行った場合のレポーター遺伝子の発現。(E)HrMA4の5'上流域-216bpの塩基配列。






T (Consensus)	 TTTCACACCT
HrMHC	 TTTCACACAG • • • • •
HrTbx6 (T_p)	 GTTCACACTT

図16 (A)HrMHCの5'上流域-132bpを顕微注入した場合のレポーター遺伝子の発現。(B)HrMHCの5'上流域-132bpとHrTbx6 mRNAとの共注入を行った場合のレポーター遺伝子の発現。(C)Tドメイン結合配列を削ったHrMHCの5'上流域-132bpを顕微注入した場合のレポーター遺伝子の発現。(D)Tドメイン結合配列を削ったHrMHCの5'上流域-132bpとHrTbx6 mRNAとの共注入を行った場合のレポーター遺伝子の発現。(E)HrMHCの5'上流域-132bpの塩基配列。

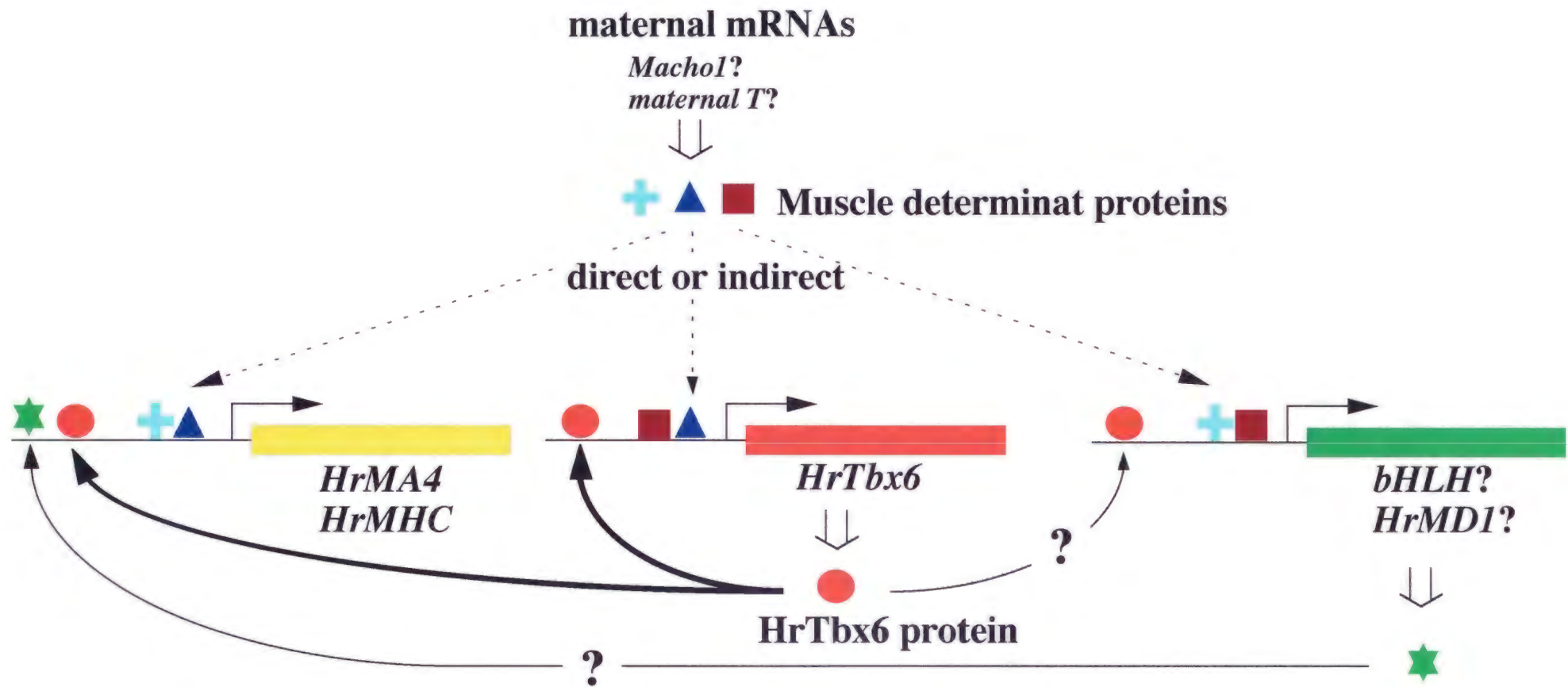


図17 筋肉細胞の分化に関わっていると考えられる遺伝子のカスケードの模式図。今回の実験により明らかになったカスケードを太実線で、また、示唆されたカスケードを細実線で示した。*HrTbx6*はTドメインの結合配列を介して直接的に筋肉特異的遺伝子の転写を活性化するほか、何らかの筋肉分化因子の転写の活性化も行っていると考えられる。

A

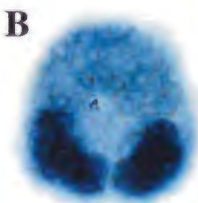
```

1  ATTCGGCACGAGGATATACACCAAAGTAAAGTACGAGTTAAATCGAAAGAGAGAGGAAA 60
61  TTGTAAGTTTATTTGGACCAGACAAGACTATGGCGAATATGATTCCAATTCATTGGCAAA 120
121 ATGAGATTGATCAAGAACATCAGAGTTTGATAAATAATTTCCAACCTCCCTTCGGTGAAT 180
181 CGGATGTTTCGAGCCCAAAGGAAAATCAATTAACACCAACTTGGCAAGATGAAAAGTTTC 240

                                     M K S F
241  ACCAAGCAGATTACCCAAGCTACCATGAACCAACTTGTCAAAATCCCTCGGAACACAA 300
      T K Q I Y P S Y H E P T C Q N P S E L Q
301  ATGGGTTTATCACAACAGACACAACCCGATTTTATCAAAGTCAACCAAGAACCAGAGGCC 360
      M G L S Q Q T Q T R F Y Q S Q P R T E A
361  CACGCAATTCGTTCCACGCTGGATCCACAGGTTCAAGTTCATCTACATGACCGGCAGTTG 420
      H A I R S P L D P Q V Q V H L H D R Q L
421  TGGGATAGTTTTCAGCGGCACAGACTGAAATGATCGTTACAAAACTGGAAGGCGAATG 480
      W D S F S A A Q T E M I V T K T G R R M
481  TTTCCCGGCTATCGAGTAAAAATGTCGGGAATGGACCCGAATGCTCAATATTCGCTACTG 540
      F P G Y R V K M S G M D P N A Q Y C V L
541  ATGGATATTTTCGAGCGTGGACGAAAACAGATACAAGTTTCAACACGGAGAGTGGTGGTA 600
      M D I S S V D E N R Y K F Q H G E W V V
601  GCGGGTCGAGGAGAACCCCAAGTTCCGCGAGAGATTTTATTTACACCCCAACTCACCTTGC 660
      A G R G E P Q V P Q R F Y L H P N S P C
661  AGCGGGCAACATGGATGAAAGAAATTTTCGTTTCATAAAGTAAAACTCACAAACTCT 720
      S G Q Q W M K E I I S P H K V K L T N S
721  TGTGGAAACTCAGCTGATGGAAAGTTCTCATACACTCCATGCATCGGTATCAACCTCGT 780
      C G N S A D G K F L I H S M H R Y Q P R
781  ATCCACATCGTTCTGACTGATGACGTCAATACCTTGTCATCTTCAACCGATGTCACCTTTC 840
      I H I V R T D D V N T L H L Q P M S T P
841  GCTTTTCGCGAAACTGTTTTCGTCACAGTAACCGCTTATCAAAATCACGAGGTACCAAAA 900
      A F P Q T V F V T V T A Y Q N H E V T K
901  TTGAAAAATAACAACAACCCATTTCGTCGGGGTTTTCGCTCAATGGAGGAAAAACCAAA 960
      L K I N N N P F A R G F R S N G G K T K
961  AATATGCTTGCAAAAACCAACAATGCGATCTTCATGTCGTCGAATCAAAATATCCGCAA 1020
      N M L A Q N Q Q C D L H V V E S N I P Q
1021  GAATATTCAAGAAAGAGAGTACAACCTCTCAACTTGGCGACGATCTCGCACAAATGGCA 1080
      E Y S R K R V Q P S Q L G D D L A Q M A
1081  AAACGCTGGCATGGGAGCTCACCATACCATGAAAAATTTTACAAGACCCCAACATCCCATA 1140
      K R W H G S S P Y H E N I Y K T Q H P I
1141  CTGTGCGCAGCATATTCCAACACAACACATCACTACAATTCCACTTTCCAACACCCG 1200
      L S P A Y S N T T Q H H Y N S T F Q H P
1201  ATGCCGCTGAATGAAATCAGTCACAACCAGCCAAATAATCAATATTATCAGCCCTATAAT 1260
      M P L N E I S H N Q P N N Q Y Y Q P Y N
1261  CACTATTCCCTCCACAAGCACAATATATTGAGAGTGAACATTTTGACTTCAGGCCAGCA 1320
      H Y S P P Q A Q Y I E S E H F D F R P A
1321  CAGTCAACATGCAAGCGTCCCGGTATTTTCGGCAGACTCCAACAGCCCCCACACACA 1380
      Q S N M Q A S P V F S A D S N S P P H T
1381  GAATCACATCTCGAGCTCAGCGTACCAACGACCACATCTTCGTTTATAACCAGCAAGTC 1440
      E S H L E L S V P T T T S S F Y N Q Q V
1441  AATTTAGAAAATGTTGTTTCTCAAACACCTACCAGTTTCGTGCCACGACGACCCCAATT 1500
      N L E N V V S Q T P T S F V P T T H P I
1501  ACTACTGCATGCGGCACGTACAAAGTTGCCAAGTGTTCGCTCTCCACTGGAATCAACT 1560
      T T A C G T V Q V A N C F R S P L D S T
1561  GACGAGGGATATATTTCACGTCACTGAGCAACCCCGATGAAGAAATAAAGAAAGTCACC 1620
      D E G Y I S T S L S N P D E E I K E V T
1621  GACGTGATCTCTACTCTAAATGACGTATTTATCGACGGATGTTTCACCAACAACATTGGA 1680
      D V I S T L N D V L S T D V S P N N I G
1681  CCAGCCAACTCCAACCTGCTGAAATTAATGGAGACATAAGTTGTGCAATTAATCTTTTG 1740
      P A N S N S A E I N G D I S C A I N L L
1741  GCAACCTCTGCTTCAATTAGCCCGATTATAAATGTAAATATTTTATGCGTCTCCCCA 1800
      A T S A S F S P I Y
1801  TTCTGTGATTTATGATTTATTTGTGTTTATAAACCAACATCAGTTTCGATTTTGTACCG 1860
1861  GTGTTTCCAATACAATTCTCTACACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1905

```

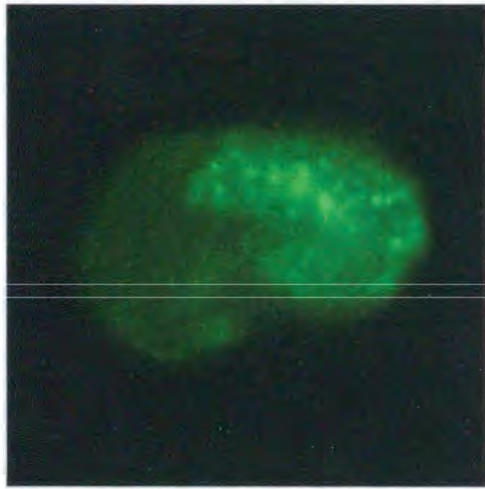
B



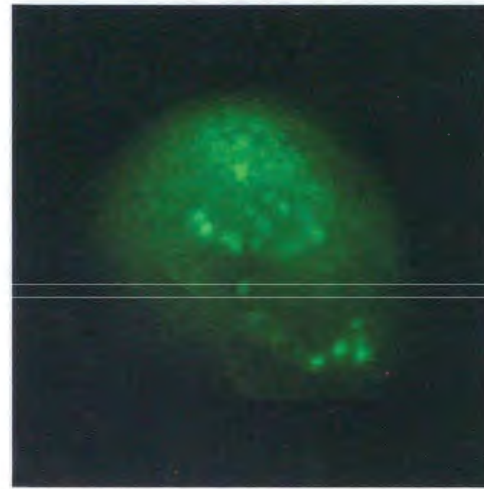
C



図18 カタユレイボヤの*HrTbx6*ホモログ*Ci-Tbx6*の塩基配列と発現パターン。(A)*Ci-Tbx6*の塩基配列。網掛けはTドメインと予想される領域。中期原腸胚期(B)、神経胚期(C)における発現パターン。



CiTbx6-GFP



CiTbx6-En-GFP

図19 エレクトロポレーションにより導入された遺伝子の発現。GFPの蛍光によりタンパク質への翻訳が観察される。

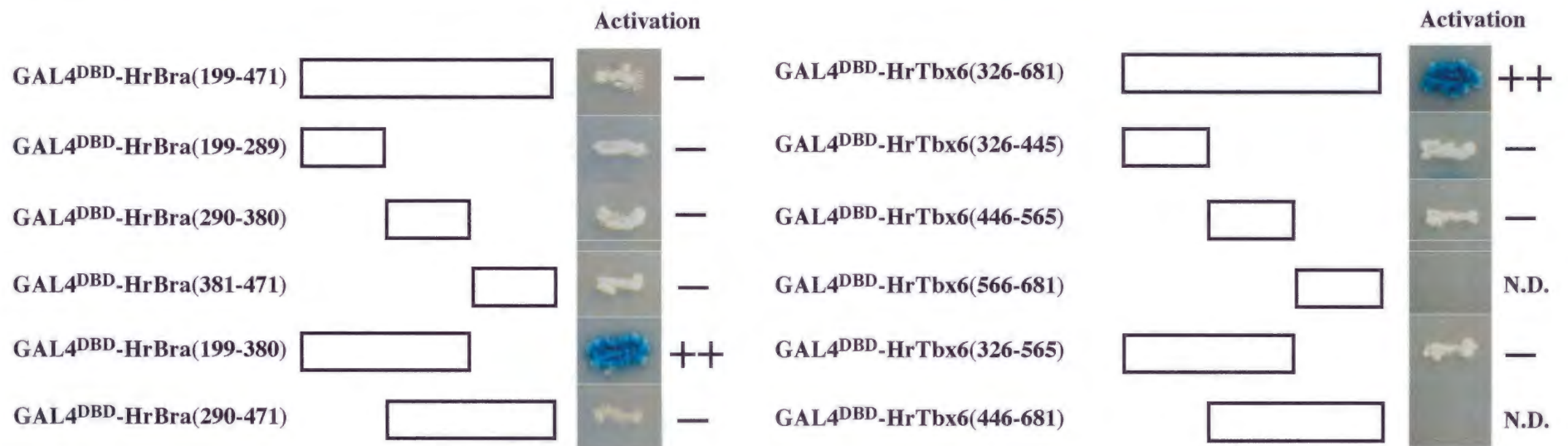


図20 HrBraおよびHrTbx6の転写活性化ドメインの解析に用いたコンストラクトの模式図と酵母によるレポーター解析の結果。転写活性のある領域では*lacZ*の発現により青色の発色がみられる。

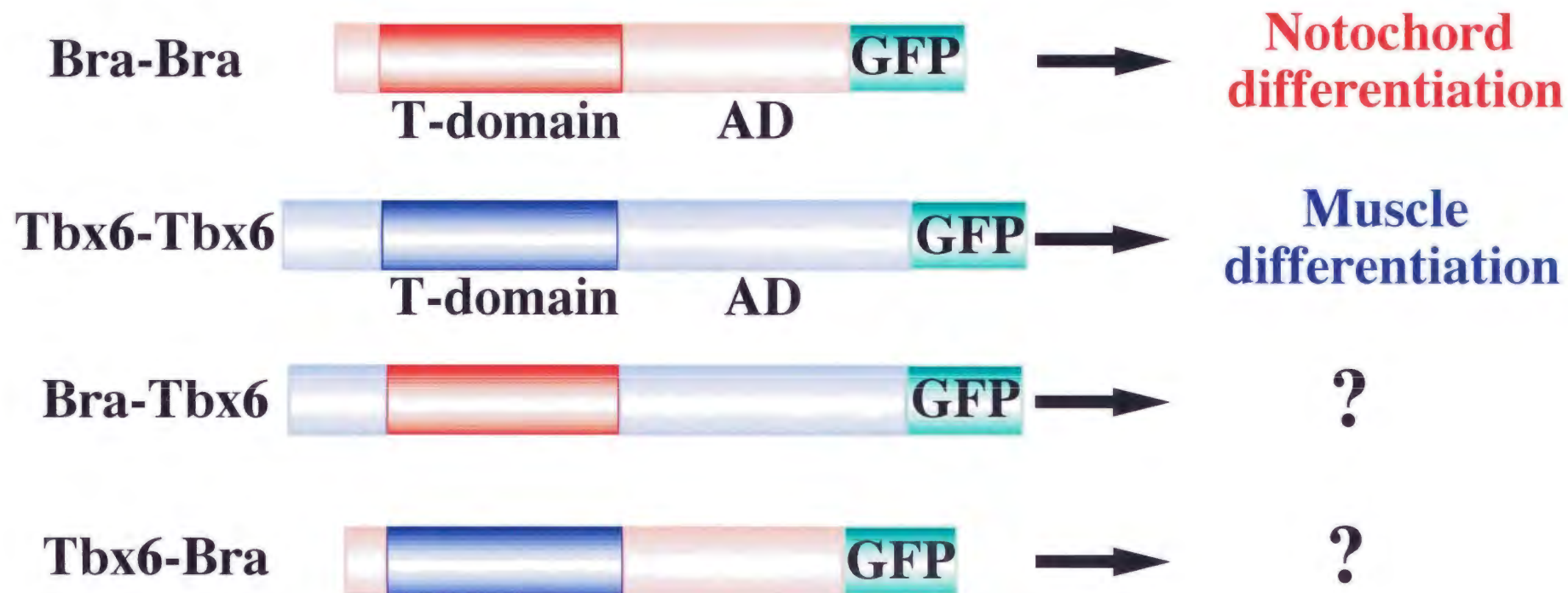


図21 キメラタンパク質の模式図。赤はHrBra、青は HrTbx6を示す。ここではTドメインと活性化ドメインの組み合わせで呼び方を決めている。したがって、HrBraはBra-Braと表記している。mRNAを顕微注入した際に翻訳されていることを確認するために C末側にGFPをつないでいる。（この図におけるタンパク質の長さは実際の比率とは異なる。）

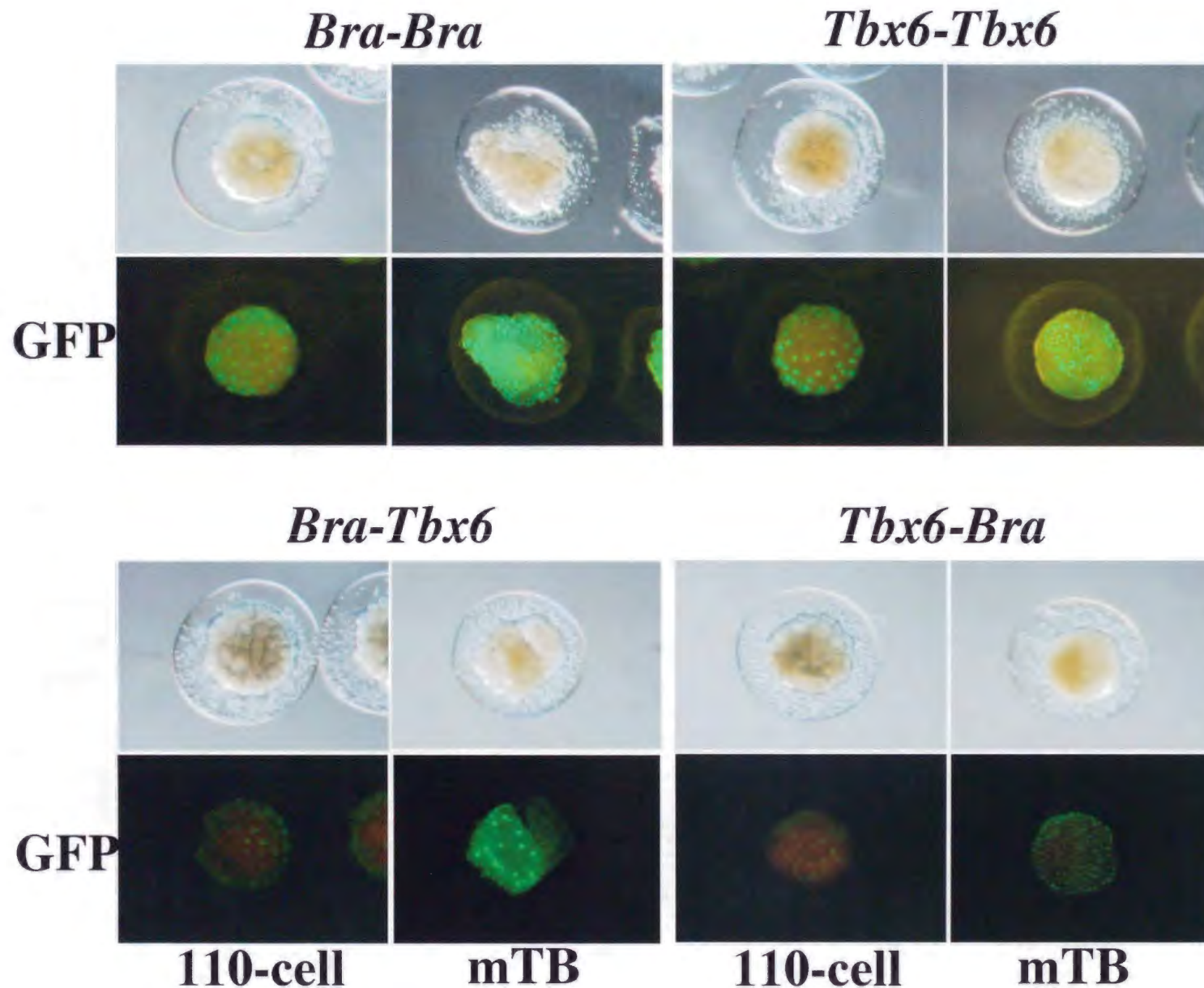
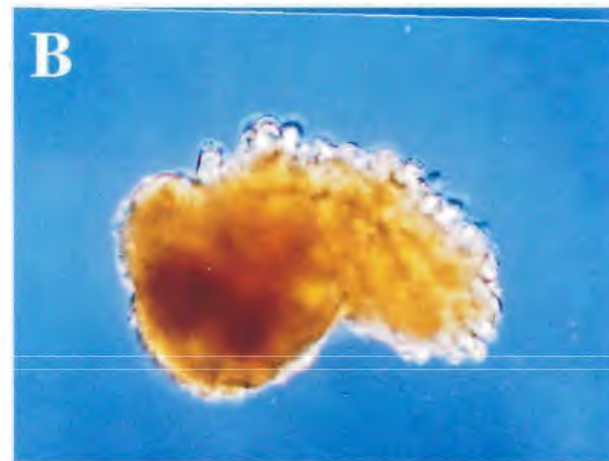


図22 キメラコンストラクトを顕微注入した胚におけるGFPの蛍光。いずれの場合にも110細胞期にはすでに翻訳されたタンパク質が作られ蛍光がみられた。また、この蛍光は中期尾芽胚期でも観察された。



Control



Bra-Tbx6

図23 *Bra-Tbx6* mRNAを顕微注入した胚の表現型。脊索細胞で特徴的にみられる液胞化した細胞が異所的に形成されている。

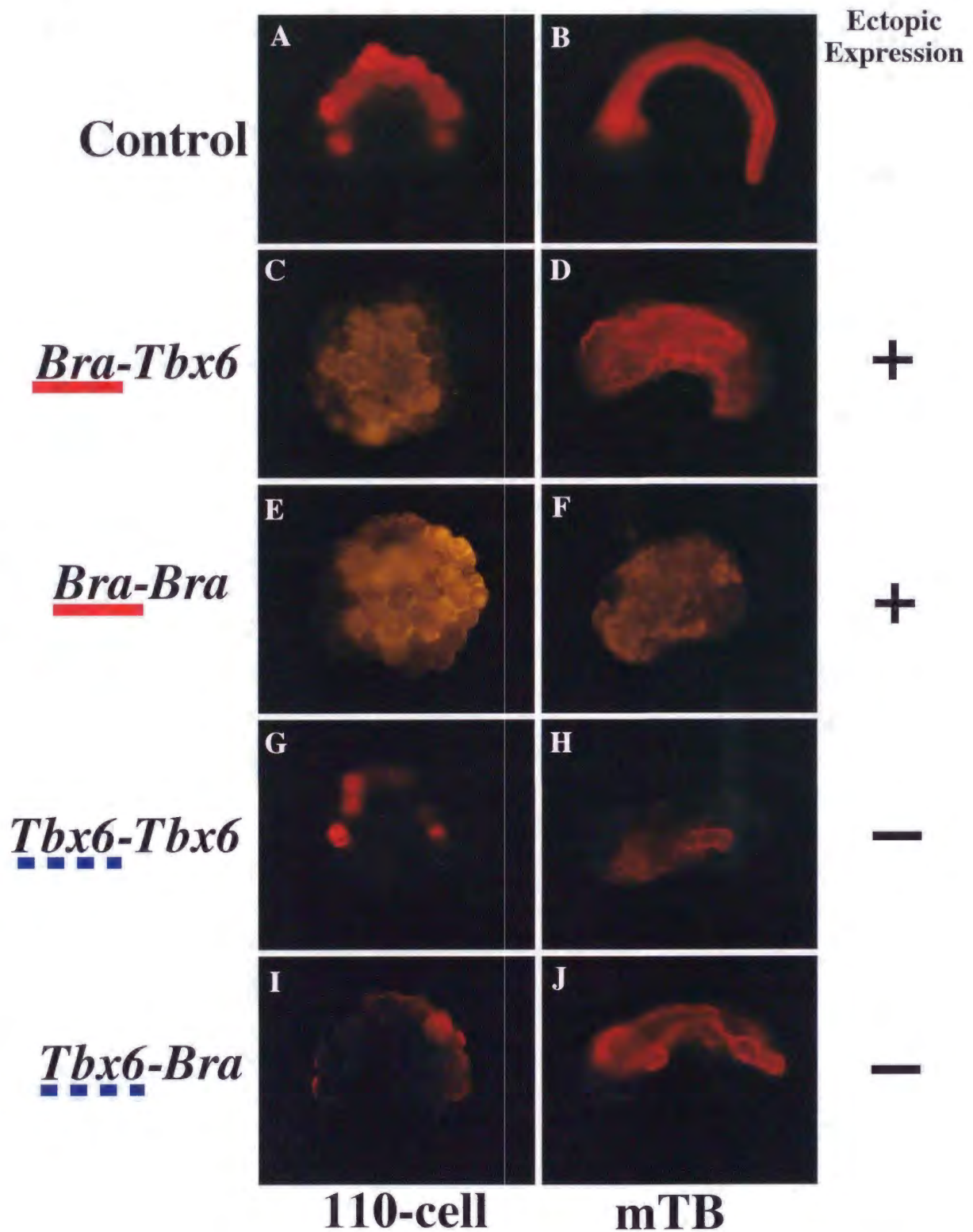


図24 脊索特異的抗体(Not-I)を用いた染色。(A,C,E,G,I)110細胞期以降サイトカラシンBで卵割を阻害し中期尾芽胚期頃に固定した胚、(B,D,F,H,J)中期尾芽胚期で固定した胚。(A,B)コントロール胚。脊索細胞でのみ染色がみられる。(C,D)Bra-Tbx6を顕微注入した胚では、Bra-Braを顕微注入した胚(E,F)と同様に異所的な発現がみられる。(G,H,I,J)Tbx6-Tbx6およびTbx6-Braを顕微注入した胚では異所的な発現はみられない。

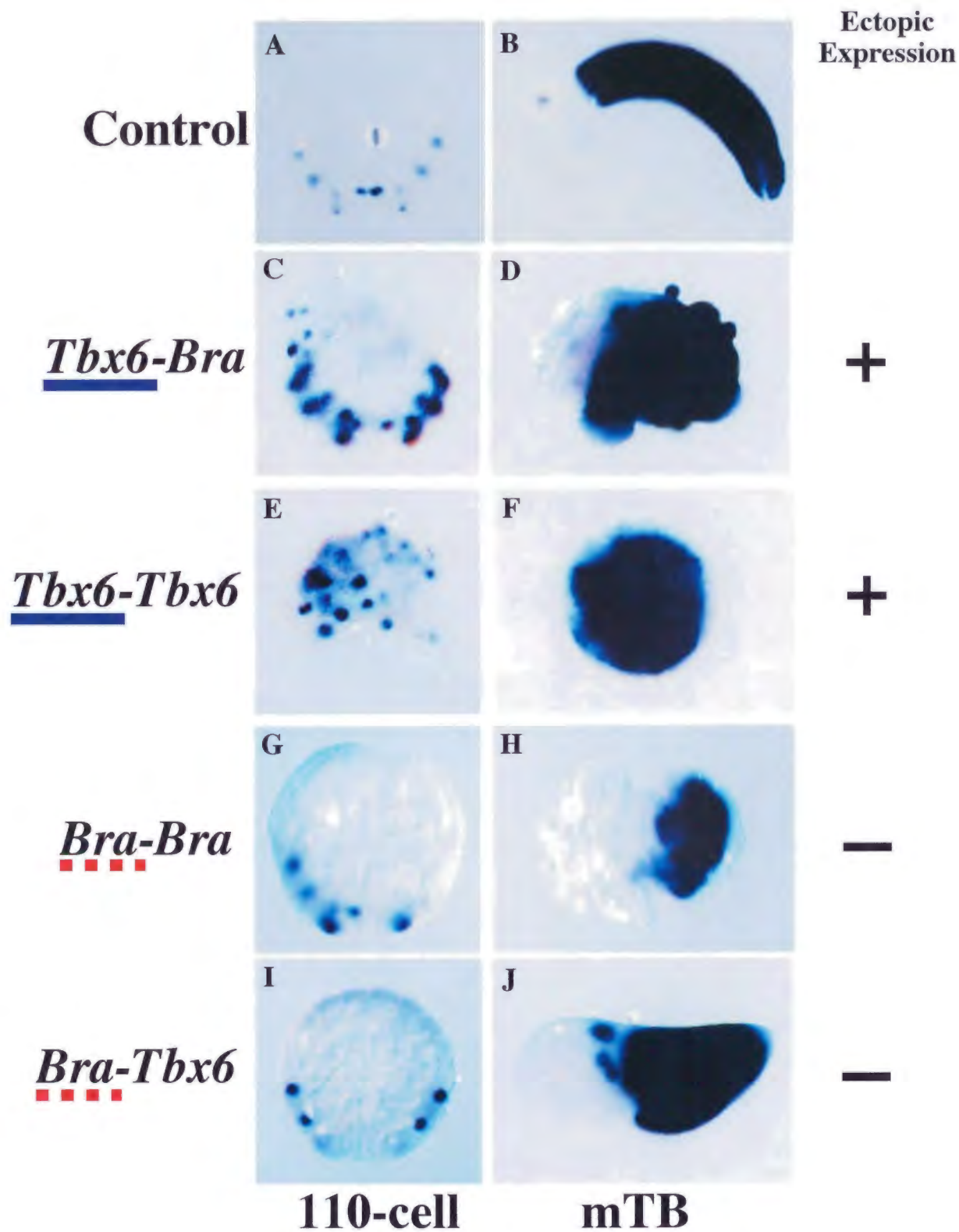


図25 キメラ遺伝子を顕微注入した胚における筋肉特異的ミオシン重鎖遺伝子(HrMHC)の発現。(A,C,E,G,I)110細胞期胚、(B,D,F,H,J)中期尾芽胚での発現。(A,B)コントロール胚。(C,D)*Tbx6-Bra*を顕微注入した胚におけるミオシン重鎖遺伝子の発現では、*Tbx6-Tbx6*の場合(E,F)と同様に異所的な発現がみられる。(G,H,I,J)*Bra-Bra*および*Bra-Tbx6*では異所的な発現はみられない。

001a	CG6444 gene product	007d	hypothetical protein C0550w
001b	Chain A, Complex Of Human Methionine Aminopeptidase-2	007e	deoxycytidine kinase
001f	CG5395 gene product	007f	brain acidic ribosomal phosphoprotein P0
001g	non-functional folate binding protein	010a	CG14701 gene product
001h	CG11266 gene product	011f	MALE-ENHANCED ANTIGEN-1
002a	claustrin	011h	6-phosphogluconolactonase
002b	methionine aminopeptidase; eIF-2-associated p67	012g	6-phosphogluconolactonase
002c	VACUOLAR ATP SYNTHASE 14 KD SUBUNIT	101a	hypothetical protein C0550w
002d	phosphatidylinositol glycan, class H	101d	non-functional folate binding protein
002e	testin	101h	golgi vesicular membrane trafficking protein p18
002g	non-functional folate binding protein	102c	ATP SYNTHASE DELTA CHAIN
003a	hypothetical protein T12G13.150	102f	golgi vesicular membrane trafficking protein
003b	ATP sulfurylase/APS kinase	103d	unnamed protein product
003c	dJ579N16.2 (SET binding factor 1)	103h	ataxia-telangiectasia mutated protein
003d	ribosomal protein S8	104b	prenylated rab acceptor 1
003e	hypothetical protein C0550w	104g	RIBONUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE REDUCTASE M2 CHAIN
003g	splicing factor, arginine/serine-rich 7 (35kD)	105a	bA424I5B.1 (novel protein)
004a	No similarity	105c	bup=5'of bmi-1 proviral insertion locus
004c	CG3918 gene product	105d	probable spindle pole body associated protein
004d	hypothetical protein C0550w	105e	hypothetical protein Rv2807
004e	hypothetical protein FLJ10815	106a	ubiquitin-conjugating enzyme ubc-2
004f	unnamed protein product	107g	RU2S
004g	human homolog of DnaJ protein	108e	hypothetical protein FLJ10902
004h	CAMP-RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN 2 (CREB2)	108f	hypothetical protein C0550w
005b	hypothetical protein XP_001244	108g	hypothetical protein C0550w
005c	glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1)	108h	hypothetical protein C0550w
005d	hypothetical protein C0550w	109a	actin related protein 2/3 complex, subunit 2
005e	RNA binding motif protein 8	109b	ENV protein
005f	No similarity	109c	histone deacetylase (EC 3.5.1.-) HD2-p39, nucleolar
006e	putative oncogene protein	109f	palmitoyl-protein thioesterase 2
006f	serine/threonine kinase receptor associated protein	109g	ecotropic viral integration site 1
006g	non-functional folate binding protein	110a	contains similarity to Pfam family 3' exoribonuclease
006h	KIAA0972 protein	110b	KIAA1629 protein
007a	hypothetical protein XP_001244	110c	ATP SYNTHASE OLIGOMYCIN SENSITIVITY CONFERRAL PROTEIN PRECURSOR
007b	hypothetical protein ycgJ	110d	cytochromes P450, CYP4T2

表 1
サブトラクションライブラリーに含まれるクローンの相同性検索の結果1

007c hypothetical protein C0550w

110f small EDRK-rich factor 2
110g 5-HT1D receptor
111c hypothetical protein C0550w
111d 40S RIBOSOMAL PROTEIN S2
111h hypothetical protein Y79H2A.6
112a laminin, gamma 1 precursor; formerly LAMB2
112b unnamed protein product
112c DNA segment on chromosome X and Y
202b CG14701 gene product
202c proteophosphoglycan
202d SURFEIT LOCUS PROTEIN 4
202g ADP-ribosylation factor-like protein
203f No similarity
203g hypothetical protein C0550w
203h No similarity
204f collagen, type IV, alpha 3
204g kinesin-like molecule
205e eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3
205f hypothetical protein FLJ10548
205g amoeboid myosin I
205h quinolate phosphoribosyltransferase
207d cysteinyl-tRNA synthetase
208b haem lyase
208e hypothetical protein C0550w
209g phospholipase A2, group IVB
210c proprotein convertase aPC6C isoform
210d hypothetical protein F09E8.2
211e inositol hexakisphosphate kinase
302b DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE II LARGEST SUBUNIT
303d hypothetical protein K02E11.2
303e voltage-dependent anion channel
305c RAB27A

110e non-structural sigma-NS protein

309f membrane transporter PFB0465c
309g Rpt4 gene product
310a Not3
310g 26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT4a
312b hypothetical protein C0550w
401c hypothetical protein C0550w
401d MigA
401g Nck, Ash and phospholipase C gamma-binding protein 4
402b ADT/ATP translocase
402f CG12220 gene product
404h UBIQUITIN-BINDING PROTEIN P62
405a unnamed protein product
405h HSPC037 protein
406b hypothetical protein W01C9.1
406h No similarity
407f casein kinase II (EC 2.7.1.-) beta chain
407h extensin
408a 26s proteasome p44.5 protein
408e cyclin A
411b hypothetical protein R03D7.2
411d KIAA1268 protein
501a PIST
501c No similarity
503b D19B gene product
505d phospholipase A2, group IVB
505e unnamed protein product
601h probable spindle pole body associated protein
602f CG7519 gene product
603f hypothetical protein C15C6.1
604b protease
604d F1E22.17
604f ELONGATION FACTOR 1-ALPHA

表 1
サブトラクションライブラリーに含まれるクローンの相同性検索の結果2

305f claudin
306a cathepsin L
306b Cas-associated zinc finger protein
307c zinc finger protein 90; Nk10 expressed protein

605a prenylated rab acceptor 1
605c arfaptin 1
608e DC2
609c G1/S-SPECIFIC CYCLIN E1

表 1
サブトラクションライブラリーに含まれるクローンの相同性検索の結果3